

**Wirkung von Antidepressiva und psychosozialem Streß auf  
die Expression eines CRE-abhängigen Reportergens  
im Gehirn transgener Mäuse**

---

Dissertation

Zur

Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)

dem

Fachbereich Pharmazie  
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

**Tahseen Alejel**

Aus Gaza

Marburg/Lahn 2001

**Vom Fachbereich Pharmazie der Philipps-Universität Marburg als Dissertation  
am                      angenommen.**

**Erstgutachter**                      **Herr Prof. Dr. Klaus Kuschinsky**

**Zweitgutachter      Herr Prof. Dr. Willhart Knepel**

## Tag der mündlichen Prüfung am

**Meiner Familie gewidmet**

## **Inhaltsverzeichnis**

<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>VII</b>
<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>2. Material und Methoden</b>	<b>11</b>
<b>2.1 Chemikalien</b>	<b>11</b>
<b>2.2 Puffer und Lösungen</b>	<b>13</b>
<b>2.3 Medien</b>	<b>16</b>
<b>2.4 Gebrauchswaren</b>	<b>17</b>
<b>2.5 Sterilisation</b>	<b>18</b>
<b>2.6 Apparatur zur Mikroinjektion</b>	<b>18</b>
<b>2.7 Präparation von Nukleinsäuren</b>	<b>19</b>
2.7.1 Isolierung genomischer DNA aus Gewebe	19
2.7.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	19
<b>2.8 Enzymatische Modifikationen von Nukleinsäuren</b>	<b>20</b>
2.8.1 DNA-Restriktionsverdauung	20
<b>2.9 Radioaktive Markierung von Nukleinsäuren</b>	<b>21</b>
2.9.1 Markierung von DNA durch “random priming“	21
<b>2.10 Radiochemikalien</b>	<b>22</b>



2.10.1 Bestimmung der Radioaktivität	22
2.10.2 Autoradiographie	22
<b>2.11 Gelelektrophorese, Isolierung und Transfer von Nukleinsäuren</b>	<b>22</b>
2.11.1 Horizontale Agarose-Gelelektrophorese (Sambrook et al., 1989)	22
2.11.2 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	23
2.11.3 Transfer von DNA aus Agarosegelen	24
<b>2.12 Hybridisierung radioaktiv markierter Sonden an membrangebundene Nukleinsäuren</b>	<b>24</b>
<b>2.13 Nachweis von Nukleinsäuren im analytischen Maßstab</b>	<b>25</b>
2.13.1 Ethidiumbromidfärbung in Agarosegelen	25
<b>2.14 Amplifikation von spezifischen DNA-Fragmenten und Transkripte mittels der“Polymerase Chain Reaction“ (PCR)</b>	<b>25</b>
2.14.1 PCR an genomischer DNA	26
2.14.2 PCR aus Gewebe	27
2.14.3 Verwendete PCR Primer	27
<b>2.15 Bestimmung der Proteinkonzentration</b>	<b>28</b>
<b>2.16 Art und Herkunft der verwendeten Mauslinien</b>	<b>28</b>
2.16.1 Mauslinien	28
<b>2.17 Methoden zur Herstellung der transgenen Mäuse 4xCRE-Luc</b>	<b>28</b>
2.17.1 Vasektomie	29
2.17.2 Superovulation	30
2.17.3 Gewinnung befruchteter Oocyten	30
2.17.4 Vorbereitung der DNA für die Mikroinjektion	31
2.17.5 Herstellung von Halte- und Injektionspipetten	32

2.17.6 Durchführung der Mikroinjektion	32
2.17.6.1 Kontrollversuche mit dem Kostrukt 6WTKlacZ	34
2.17.7 Retransfer mikroinjizierter Oocyten	35
2.17.8 Markierung und Analyse der erzeugten Tiere	36
<b>2.18 Computerunterstützte Analyse von Sequenzdaten</b>	<b>36</b>
<b>2.19 Messung der Luciferase-Aktivität im Gehirn und Peripherie</b>	<b>37</b>
<b>2.20 Nachteule (Night Owl LB 981), Systembeschreibung</b>	<b>37</b>
2.20.1 Aufbau und Funktion einer CCD-Kamera	37
2.20.2 Einsatz und Arbeitsweise	37
<b>2.21 Herstellung von coronaren und sagittalen Kryoschnitten</b>	<b>38</b>
<b>2.22 Herstellung von coronaren nativen Schnitten</b>	<b>38</b>
<b>2.23 Herstellung von seriellen coronaren nativen Schnitten</b>	<b>39</b>
<b>2.24 Vergleich der Luciferase-Aktivität in der rechten und der linken Hemisphäre im Gehirn 4xCRE-Luc-transgener Mäuse</b>	<b>39</b>
<b>2.25 Inkubation von nativen coronaren Gehirnschnitten 4xCRE-Luc-transgener Mäuse</b>	<b>39</b>
<b>2.26 Gewebeentnahme und Präparation nach dem jeweiligen in vivo Versuch</b>	<b>40</b>
<b>2.27 Homogenisieren der einzelnen Gewebeproben und Messung der Luciferase-Reportergen-Aktivität</b>	<b>41</b>

<b>2.28 Messung der Luciferase im Homogenat</b>	<b>42</b>
<b>2.29 Tiermodell der Depression: Chronischer psychosozialer Streß</b>	<b>43</b>
<b>2.30 Behandlung von 4xCRE-Luc-transgenen Mäusen mit Antidepressiva</b>	<b>44</b>
2.30.1 Chronische Behandlung	44
2.30.2 Akute Behandlung	44
2.30.3 Chronische Behandlung von dem psychosozialen Streß ausgesetzten Mäusen	44
<b>2.31 Software, Statistik</b>	<b>45</b>
<b>3. Ergebnisse</b>	<b>46</b>
3.1 Herstellung der transgenen Mäuse 4xCRE-Luc	46
<b>3.2 Expression des Luciferase-Reportergens</b>	<b>48</b>
3.2.1 Untersuchung der Expression des Luciferase-Reportergens im Gehirn und in peripheren Geweben der 4xCRE-Luc-transgenen Mäuse der Linien 32.3, 32.7 und 38.1	48
3.2.2 Darstellung der Luciferase-Expression an Schnitten des Gehirns 4xCRE-Luc-transgener Mäuse der Linien 32.7 und 38.1	51
3.2.3 Verteilung des Luciferase-Reportergens im Gehirn von rostral nach caudal	57
3.2.4 Verteilung der Luciferase-Expression in der linken und der rechten Hemisphäre	58
<b>3.3 Wirkung von Veratridin auf die Luciferase-Expression in Gehirnschnitten in vitro</b>	<b>59</b>
3.3.1 Konzentrationswirkungskurve von Veratridin	59
3.3.2 Zeitabhängigkeit der Veratridinwirkung	61
3.3.3 Wirkung von Tetrodotoxin auf die Hemmung der Luciferase-Expression durch Veratridin	62

<b>3.4 Wirkung von Antidepressiva auf die Expression des 4xCRE-Luc-Reportergens in vivo</b>	<b>63</b>
3.4.1 Wirkung einer akuten Behandlung mit dem Antidepressivum Imipramin auf die Expression des Reportergens in 4xCRE-Luc-transgenen Mäusen in vivo	63
3.4.2 Wirkung einer Dauerbehandlung mit dem Antidepressivum Imipramin auf die Expression des Reportergens in 4xCRE-Luc-transgenen Mäusen in vivo	65
3.4.3 Wirkung einer Dauerbehandlung mit dem Antidepressivum Fluoxetin auf die Expression des Reportergens in 4xCRE-Luc-transgenen Mäusen in vivo	67
3.4.4 Wirkung einer Dauerbehandlung mit dem Antidepressivum Desipramin auf die Expression des Reportergens in 4xCRE-Luc-transgenen Mäusen in vivo	69
 <b>3.5 Wirkung von psychosozialem Streß bzw. psychosozialem Streß und Imipramin auf die Expression des Reportergens in 4xCRE-Luc-transgenen Mäusen in vivo</b>	 <b>71</b>
3.5.1 Wirkung von chronischem psychosozialem Streß auf die Expression des Reportergens in 4xCRE-Luc-transgenen Mäusen in vivo	71
3.5.2 Wirkung von chronischem psychosozialem Streß und Imipramin auf die Expression des Reportergens in 4xCRE-Luc-transgenen Mäusen in vivo	73
 <b>3.6 Wirkung von psychosozialem Streß bzw. psychosozialem Streß und Imipramin auf das Körpergewicht der untersuchten 4xCRE-Luc-transgenen Mäuse</b>	 <b>74</b>
3.6.1 Wirkung von dauerhaftem psychosozialem Streß auf das Körpergewicht der untersuchten transgenen Mäuse	74
3.6.2 Wirkung von psychosozialem Streß und Imipramin auf das Körpergewicht der untersuchten 4xCRE-Luc-transgenen Mäuse	76

<b>4. Diskussion</b>	<b>77</b>
<b>4.1 4xCRE-Luc-transgene Mäuse zur Untersuchung der CRE-vermittelten Transkription in vivo</b>	<b>77</b>
<b>4.2 Chronische, aber nicht akute, Behandlung mit Antidepressiva hemmt die Expression des CRE-abhängigen Reportergens substanzspezifisch in vivo</b>	<b>78</b>
<b>4.3 Psychosozialer Streß erhöht die Expression des CRE-abhängigen Reportergens in 4xCRE-Luc- transgenen Mäusen in vivo</b>	<b>81</b>
<b>4.4 Imipramin hemmt in Mäusen, die psychosozialem Streß ausgesetzt waren, die Expression des CRE-abhängigen Reportergens</b>	<b>84</b>
<b>5. Zusammenfassung</b>	<b>86</b>
<b>6. Literaturverzeichnis</b>	<b>87</b>

**Abkürzungsverzeichnis**

A	Adenin
Abb.	Abbildung
Abs.	absolut
Akt/PKB	Proteinkinase B
Ampuwa	Aqua ad injectabilia
BSA	Rinderserumalbumin
Bp	Basenpaare
BZip	basic-domain-leucine-zipper
c	centi
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
CaM	Calmodulin
cAMP	zyklisches Adenosin-3',5'-monophosphat
Ci	Curie
cpm	counts per minute
CRE	cAMP-responsives Element
dNTP	Desoxynukleotid-5'-triphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidin-5'-triphosphat
EDTA	Ethylendiamin-Tetra-Acetat
EGTA	Ethylenglycol-bis-(2-aminoethylether)-N, N'-Tetra-Acetat
et al.	Et alii
EtBr	Ethidiumbromid
FSH	Follitropin (follikelstimulierendes Hormon)
g	Gramm

G	Guanin
h	Stunde(n)
hCG	Predalon
5-HT	5-Hydroxytryptamin
i. p.	intraperitoneal
IU	International Unit
kb	Kilobasen
kD	Kilodalton
KP-Puffer	Kalium-Phosphat-Puffer
l	Liter
LH	Lutropin (luteinisierendes Hormon)
MAPKAP 2	mitogen-activated protein kinase activated protein kinase 2
m	Meter; milli ( $1 \times 10^{-3}$ )
min	Minute
MSK1	mitogen and stress-activated protein kinase 1
MW	Molekulargewicht
$\mu$	mikro ( $1 \times 10^{-6}$ )
n	nano ( $1 \times 10^{-9}$ )
NA	Natriumacetat
$^{32}\text{P}$	Isotop 32 des Phosphors
Pa	Pascale
p	piko ( $1 \times 10^{-12}$ )
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (Phosphate-Buffered Saline)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction)
pH	pH-Wert
PMS	Intergonan
PMSF	Phenylmethyl-Sulfonylfluorid
PVC	Polyvinylchlorid
p70 S6K	70 kDa ribosomal S6 kinase
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur

s	Sekunde
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SEM	Standardfehler des Mittelwertes (Standarderror of the Mean)
SomCRE	SomatostatinCRE
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TK	Thymidin-Kinase
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TTX	Tetrodotoxin
U	Unit, Enzymeinheiten
UpM	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
VDCC	voltage-dependent Calcium-channel
VTD	Veratridin
V	Volt
Vol.	Volumen
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Masse pro Volumen
W	Watt



## **1. Einleitung**

Unter der Bezeichnung Depression werden unterschiedliche psychische Krankheiten zusammengefaßt (Siehe Tab. 1), die ca. 6-10 % der Bevölkerung betreffen. Dementsprechend variiert auch die Symptomatik der Erkrankungen. Die Patienten können ein ängstlich-agitiertes, ängstlich-gehemmtes, apathisches oder neurasthenisch-hypochondrisches Verhalten zeigen.

Tab. 1 Formen der Depressionen nach Kielholz.

Aus: Estler, 2000

---

**Organische Depressionen**

(z.B. senile Depressionen)

---

**Symptomatische Depressionen**

(z. B. toxische Depressionen)

---

**Depressionen bei schizophrenen Psychosen**

---

**Endogene Depressionen**

Psychogene Depressionen

Neurotische Depressionen

Erschöpfungsdepressionen

Reaktive Depressionen

---

### **Klinisches Wirkprofil von Antidepressiva**

Die Wirkung von Antidepressiva setzt erst etwa zwei bis drei Wochen nach Erreichen der Volldosis ein (bei leichteren Formen gelegentlich etwas schneller). Alle Antidepressiva hellen die depressive Verstimmung auf, wobei es eine Rolle spielt, ob die Depression Folge einer psychischen Belastungssituation, einer neurotischen Fehlentwicklung, einer somatischen Erkrankung oder einer genetischen Veranlagung ist. Parallel zur Verbesserung der Grundstimmung werden auch Unruhe und Störungen von Angstwahrnehmung, Denken, Schlaf, Appetit, der Funktionen und Wahrnehmung des Körpers positiv geändert oder sogar

beseitigt (Laux, 1998; Berthold, 1999; Forth et al., 2001). Die verschiedenen Antidepressiva unterscheiden sich in der unterschiedlichen Gewichtung ihrer Wirkung und ihrem Nebenwirkungsprofil (Müller-Oerlinghausen, 1999; Forth et al., 2001). Schwer antriebsgehemmte Patienten bekommen Antidepressiva zur Verbesserung des Antriebs, während unruhig agitierte, ängstliche Patienten vor allem mit suizidalen Tendenzen eher sedierende, beruhigende und angstlösende Antidepressiva benötigen (Eckert und Müller, 1998; Forth et al., 2001). Darüber hinaus können auch Patienten mit Angst- und Panikstörungen, Zwangsstörungen und Eßstörungen von Antidepressiva profitieren. Außerdem können Antidepressiva als Begleittherapie bei schweren chronischen Schmerzen wie Tumorschmerzen, diabetischer Polyneuropathie, Trigeminusneuralgie, posttraumatischem Phantomschmerz etc. indiziert sein. In der Klinik werden Antidepressiva nicht nur unterstützend in der Psychiatrie und Psychosomatik eingesetzt: Sie können auch bei Patienten, die aufgrund ihrer schweren Grunderkrankung, erheblicher Schmerzen oder einer langen Liegedauer depressiv geworden sind, die Stimmung aufhellen, den Schlaf verbessern, die Gesamteinstellung zum Heilungsverlauf und auch die aktive Mithilfe bei der Rehabilitation verbessern (Berthold, 1999; Forth et al., 2001).

### **Wirkungsmechanismen**

Allen Antidepressiva ist gemeinsam, daß sie in den Stoffwechsel und die Kinetik zentraler Neurotransmitter eingreifen mit Verlängerung und/oder Verstärkung der Serotonin-Wirkung bzw. Verlängerung und/oder Verstärkung der Noradrenalin-Wirkung (Estler, 2000; Forth et al., 2001).

Mittels **Serotonin** (= 5-Hydroxytryptamin = 5-HT) erfolgt die Erregungsübertragung an zentralen Synapsen, deren Fasern in den Raphekernen, anderen Brückenkernen und der Medulla oblongata entspringen und u. a. aufsteigend zum limbischen System, Hypothalamus und zur Großhirnrinde sowie absteigend zu den Vorder- und Hinterhörnern des Rückenmarks ziehen. Serotoninerge Neurone findet man außerdem im gesamten Gastrointestinaltrakt. Das meiste Serotonin findet sich jedoch extraneuronal in enterochromaffinen Zellen und in Blutplättchen. Zentrale serotoninerge Neurone tragen zur Schmerzunterdrückung, dem Schlaf-Wach-Rhythmus, der Regulation der Körpertemperatur und der Nahrungsaufnahme, periphere

serotoninerge Neurone zur gastrointestinalen Motilität bei. Von den serotoninen Rezeptoren (5-HT<sub>1</sub>- bis 5-HT<sub>7</sub>) wurden besonders viele (bis jetzt 14) Subtypen nachgewiesen. Als Grund für diese Vielfalt wird vermutet, daß es sich bei dem Serotonin-Rezeptor um einen in der Evolution schon sehr frühzeitig entstandenen Rezeptor handelt (Mutschler, 1996; Forth et al., 2001).

**Noradrenalin** ist ein wichtiger Transmitter der postganglionär-sympathischen Neurone sowie zahlreicher Synapsen im Zentralnervensystem (noradrenerger Synapsen). Noradrenerge Neurone verlaufen z.B., ausgehend von Kerngebieten im Bereich der Brücke und der Medulla oblongata, aufsteigend zum Hypothalamus, Thalamus, limbischen System und zur Großhirnrinde sowie absteigend zu den Vorder- und Hinterhörnern des Rückenmarks. Im Gehirn kommt es als Transmitter vorwiegend in Neuronen im Locus coeruleus vor und beeinflusst sehr grundlegende Körperfunktionen wie den Schlaf-Wach-Rhythmus, die Nahrungsaufnahme und Kreislaufregulation. Eine Verlängerung oder Verstärkung der Noradrenalin-Wirkung ist dementsprechend häufig von einer Reihe zentraler und auch peripherer Nebenwirkungen begleitet (Mutschler, 1996; Forth et al., 2001).

### **Die tri- und tetrazyklischen Antidepressiva (TZA) wie z. B. Imipramin, Desipramin,**

hemmen die neuronale Wiederaufnahme von Serotonin und/oder Noradrenalin, das in den synaptischen Spalt freigesetzt wurde, und verlängern dadurch die Wirkung dieser Transmitter. Da Trizyklika die Noradrenalin-Wiederaufnahme auch in der Peripherie hemmen und zusätzlich Rezeptoren für Acetylcholin, Noradrenalin und auch Histamin hemmen, haben sie eine Reihe häufiger und teilweise klinisch bedeutender und für die Patienten belastender Nebenwirkungen: Aufgrund der anticholinergen Wirkung können Mundtrockenheit, verstopfte oder trockene Nase, Akkommodationsstörungen, Obstipation und Miktionsbeschwerden auftreten. Noch bedeutsamer sind kardiovaskuläre Störungen wie Blutdrucksenkung, Tachykardie und – durch Natriumkanalblockade bedingt- Überleitungsstörungen. (Mutschler, 1996; Estler, 2000; Forth et al., 2001).

**Selektive Serotonin-Wiederaufnahme-Hemmer (SSRI=Selective Serotonin Reuptake Inhibitors) wie z. B. Fluoxetin,**

haben dieselbe Hauptwirkung wie klassische TZA, wirken allerdings sehr viel spezifischer an der neuronalen Serotonin-Wiederaufnahme der zentralnervösen Neuronen. Da sie nicht oder nur sehr gering an Noradrenalin-, Acetylcholin- und Histaminrezeptoren binden, haben sie eine wesentlich geringere Nebenwirkungsrate und ein zum Teil wesentlich besseres Sicherheitsprofil (Mutschler, 1996; Estler, 2000; Forth et al., 2001).

Bei suizidalen Patienten ist zu beachten, dass unter SSRI die Stimmungsaufhellung erst nach der Aktivitätssteigerung einsetzen kann, was anfänglich zu einer erhöhten Selbstmordgefährdung führt. Agitiertheit und Angst sind mit bis zu 20% die häufigsten Nebenwirkungen von SSRI und auch von Venlafaxin (siehe unten). Gefährlich wäre es, SSRI mit Serotonin-Agonisten wie Sumatriptan, ein Migräne-Therapeutikum, Tryptophan, ein Medikament zur Behandlung von Schlafstörungen oder einem MAO-Hemmer zu kombinieren, weil dies zu einer schleichenden, gefährlichen Verstärkung der Serotoninwirkung bis hin zum bedrohlichen Serotonin-Syndrom mit Verhaltens- und Bewusstseinsstörungen, Fieber, Magen-Darm-Beschwerden, Tremor, Myoklonien, Unruhe, Schwindel und Organversagen führen kann. Deshalb ist, auch im Hinblick auf die oft sehr langen Halbwertszeiten, beim Wechsel von einem Serotonin-aktiven Antidepressivum auf ein anderes grundsätzlich ein mehrwöchiger Sicherheitsabstand einzuhalten (Mutschler, 1996; Estler, 2000; Forth et al., 2001).

**Monoaminoxidase-Inhibitoren (MAO-Hemmer),**

vermindern den Abbau von Serotonin und Noradrenalin im Gehirn. Verwendet wird heute ganz überwiegend der reversible MAO-A-Hemmer Moclobemid, nicht mehr dagegen der irreversible MAO-A/B-Hemmer Tranylcypromin, der zu teilweise schweren Blutdruckkrisen und Schlaflosigkeit geführt hatte und eine Reihe strenger diätetischer Maßnahmen forderte (keine Tyramin-haltigen Nahrungsmittel). Doch sollen auch unter Moclobemid-Gabe keine Sympathomimetika und Amphetamine verabreicht werden.

**Lithiumsalze** (Acetat, Carbonat) sind heute vor allem zur Prophylaxe bei zyklischem (biphasischem) Verlauf depressiver Psychosen (Zyklothymie) die Mittel der Wahl. Zur Therapie manischer Phasen werden ebenfalls Lithiumsalze in höher Dosierung eingesetzt. Lithium hemmt die Inositolmonophosphat-Phosphatase. Es wird weniger Inositol gebildet, das zur Resynthese von Phosphatidylinosit-4,5-bisphosphat (PIP<sub>2</sub>) benötigt wird, und die Phospholipase-C-PIP<sub>2</sub>-Signaltransduktion läuft nicht mehr normal ab. Lithium würde demnach die Aktivität von Neuronen mit Phospholipase-C-PIP<sub>2</sub>-gekoppelten Rezeptorsystemen vermindern. Der Weg von diesen neurochemischen Effekten zur therapeutischen Wirkung ist aber unbekannt. (Mutschler, 1996; Estler, 2000; Forth et al., 2001).

**Mirtazapin** blockiert den Serotonin und den Noradrenalin-Reuptake im Gehirn und wirkt nicht nur stimmungsaufhellend, sondern verbessert auch den Schlaf. Das Medikament ist besser verträglich als TZA. Vermutlich greift es jedoch auch in den Stoffwechsel des Knochenmarks ein, denn es werden gelegentlich Blutbildveränderungen bis hin zur Agranulozytose beobachtet (Mutschler, 1996; Estler, 2000; Forth et al., 2001).

**Venlafaxin** hemmt die Wiederaufnahme von Serotonin und Noradrenalin, ist aber anders aufgebaut als andere Antidepressiva. Die Patienten klagen unter Venlafaxin häufig (bis zu 50%) unter Kopfschmerzen; auch andere Nebenwirkungen wie Übelkeit, Müdigkeit, Schlafstörungen etc. scheinen recht häufig aufzutreten (Mutschler, 1996; Estler, 2000; Forth et al., 2001).

**Reboxetin** hemmt selektiv den Noradrenalin-Reuptake und bindet an keine anderen (adrenergen, histaminergen, muskarinergen, dopaminergen) Rezeptoren. Zentrale Nebenwirkungen sind viel seltener als bei TZA. (Estler, 2000; Berthold, 1999; Forth et al., 2001; Müller-Oehrlinghausen, 1999; Laux, 1998; Eckert und Müller, 1998; Mutschler, 1996).

**Transgene Mäuse und der molekulare Wirkungsmechanismus der Antidepressiva**

Antidepressiva sind klinisch wichtige Arzneimittel, welche zur Therapie depressiver Erkrankungen eingesetzt werden. Ihre klinische Effizienz ist allgemein anerkannt, aber der Wirkungsmechanismus der Antidepressiva ist unklar (Mutschler, 1996). Entsprechend der sogenannten Amin-Hypothese erhöhen Antidepressiva die Konzentration von Neurotransmittern wie Serotonin und/oder Noradrenalin im synaptischen Spalt und können so einen bei Depression postulierten Mangel an Noradrenalin und/oder Serotonin an kritischen zentralen Synapsen beseitigen (Heninger und Charnay, 1987). Das Antidepressivum Imipramin hemmt gleichermaßen die Wiederaufnahme von Noradrenalin und Serotonin; Desipramin hemmt ganz bevorzugt die Wiederaufnahme von Noradrenalin und Fluoxetin hemmt selektiv die Wiederaufnahme von Serotonin aus dem synaptischen Spalt in die Nervenenden (Mongeau et al., 1997). Es besteht jedoch ein klarer Widerspruch zwischen der raschen Erhöhung der synaptischen Konzentration von biogenen Aminen durch Antidepressiva und der fehlenden akuten klinischen Wirksamkeit der Antidepressiva zu Beginn der Therapie (Heninger und Charnay, 1987). Die antidepressive Wirkung stellt sich unter fortgesetzter Therapie erst mit einer Verzögerung von 1-3 Wochen ein (Mutschler, 1996). Dies weist auf langsame adaptativen Änderungen hin, welche der antidepressiven Wirkung zugrunde liegen, und welche auf molekularer Ebene mit einem durch Antidepressiva veränderten Muster an exprimierten Genen erklärt werden könnten (Mutschler, 1996; Duman et al., 1999). Veränderungen in der Expression von Genen werden auch als Ursache der Depression diskutiert (Duman et al., 1999). Antidepressiva könnten somit die in der Depression auftretenden Störungen in der Expression von Genen ausgleichen. Untersuchungen zur Wirkung von Antidepressiva auf die Transkription von Genen (und damit deren Expression) stehen ganz am Anfang. Es ist möglich, daß die durch die verschiedenen Antidepressiva induzierte Wiederaufnahme-Hemmung der Neurotransmitter nur den Anfang einer Kaskade von Ereignissen repräsentiert, die zu den neuronalen adaptativen Änderungen und Modifikationen der synaptischen Transmission führen. Die Wirkung von Neurotransmittern bei der Erregungsübertragung und Informationsverarbeitung wird wesentlich durch die Eigenschaften der Zielstrukturen mitbestimmt. Wichtige Komponenten der Zielstrukturen sind Neurotransmitter-Rezeptoren, Membrankanäle und Second-

Messenger-Systeme, zwischen denen vielfältige Wechselwirkungen bestehen. Diese beeinflussen letztlich das Membranpotential, den Metabolismus und die Genexpression der Zielzellen, was sich in kurz- und langfristigen Veränderungen der Aktivitätsmuster niederschlägt (Kelso et al., 1992; Turecek et al., 1995; Yokoshiki et al., 1996). Im folgenden werden wichtige Eigenschaften von Membranrezeptoren und Second-Messenger-Systemen beschrieben und ihre Bedeutung für das Verhalten der Zelle aufgezeigt. Neurotransmittersignale werden durch ionotrope und metabotrope Rezeptoren vermittelt. Die Stimulation ionotroper Rezeptoren führt zu einer vorübergehenden Erhöhung der Membranleitfähigkeit für bestimmte Ionen. Durch Stimulation metabotroper Rezeptoren kommt es zur Aktivierung von Rezeptor-assoziierten Enzymen, die metabolische Prozesse im Zellinneren anstoßen (Mutschler, 1996; Estler, 2000; Forth et al., 2001). Der Second-Messenger Calcium in Verbindung mit Calmodulin aktiviert verschiedene intrazelluläre Enzyme (Hanson und Schulman, 1992; Hartwig et al., 1992). Die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration reguliert in Neuronen, wie in anderen Zellen, eine Fülle von physiologischen Parametern. Zudem ist Calcium an vielen Signaltransduktionsprozessen beteiligt, die den Informationsfluß innerhalb einer Zelle, zwischen zwei Zellen und zwischen den Zellen eines vernetzten Neuronenverbandes ermöglichen (Hanson und Schulman, 1992; Hartwig et al., 1992; Finkbeiner und Greenberg, 1998). Calcium aktiviert Enzyme wie CaM-Proteinkinase, Phosphodiesterase, Proteinphosphatase 2B (= Calcineurin) oder Adenylatcyclase (Finkbeiner und Greenberg, 1998). Für eine maximale Aktivierung dieser Enzyme ist die Bindung von vier Calcium-Ionen an das Calcium-bindenden Protein Calmodulin (CaM) erforderlich. Calciumpermeable Kanäle können sowohl spannungsgesteuert als auch durch Liganden gesteuert sein (Finkbeiner und Greenberg, 1998). Calciumkanäle vom L-Typ sind unter anderem für die Regulation der Genexpression verantwortlich (Deisseroth et al., 1996). Einige metabotrope Rezeptoren koppeln in der Zellmembran an ein stimulatorisches G-Protein (Gs). Nach Rezeptoraktivierung stimuliert Gs eine Adenylatcyclase. Die Adenylatcyclase bewirkt die Umwandlung von ATP zu cyclischem Adenosinmonophosphat (cAMP), das neben Calcium als ein weiterer Second-Messenger betrachtet wird. Durch Bindung mehrerer Moleküle cAMP an die regulatorische Untereinheit der Proteinkinase A (PKA) werden die katalytischen Untereinheiten in aktiver Form freigesetzt, was zur Phosphorylierung verschiedener Proteine führt, wie z.B. den Transkriptionsfaktor (CREB) (Sassone-Corsi,

1995). Somit stehen die adaptativen Änderungen mit der intrazellulären Signalübertragung in Wechselwirkung. Einige dieser adaptativen Änderungen schließen Modifikationen in der Empfindlichkeit und/oder Dichte der verschiedenen Rezeptoren ein (Schildkraut 1965; Iversen 1975; Baker und Greenshaw, 1989; Owens und Nemeroff 1994). Es kommt nach chronischer Antidepressiva-Behandlung zu einer Hyper-Empfindlichkeit von postsynaptischen 5-HT<sub>1A</sub> Rezeptoren und Hypo-Empfindlichkeit von 5-HT<sub>1A</sub> Auto-Rezeptoren. Es wird angenommen, daß diese adaptativen Änderungen mit der Antidepressiva-Wirkung in Wechselbeziehung stehen (De Montigny et al., 1990). Die Dichte der 5-HT<sub>2</sub> Rezeptoren nimmt nach chronischer Behandlung mit typischen Antidepressiva ab, während die Elektroschock-Behandlung (ECS, electroconvulsive) die Anzahl bestimmter 5-HT Rezeptor-Subtypen erhöht (Peroutka und Snyder, 1980; Biegon und Israeli, 1987). Es ist bekannt, daß andere Nicht-5-HT-Rezeptoren für chronische Antidepressiva-Behandlung eine Empfindlichkeit zeigen, wie beta-Adreno-Rezeptoren und auch alpha-2-Adreno-Rezeptoren, GABA<sub>B</sub>-, dopaminerge, Muscarin-, und Glucocorticoid-Rezeptoren (Baker und Greenshaw, 1989; Seckl und Fink, 1992; Skolnick et al., 1996). Frühere Befunde legten nahe, daß die Verzögerung der Antidepressiva-Wirkung mit adaptativen Änderungen zu tun haben (Lesch und Manji, 1992; Wong et al., 1996). Diese adaptativen Änderungen sind vermutlich durch verschiedene Transkriptionsfaktoren vermittelt. Transkriptionsfaktoren sind Proteine welche nach Aktivierung/Phosphorylierung durch intrazelluläre Signale spezifische DNA-Sequenzen binden, die in den regulatorischen Abschnitten der Zielgene lokalisiert sind. Eines der am besten untersuchten responsiven Elemente in der Genpromotor-Region ist das CRE (cyclic AMP response element). CRE, welches u. a. die transkriptionelle Aktivität der c-AMP-aktivierten Proteinkinase A vermittelt, wird von einer Transkriptionsfaktoren-Familie erkannt, zu der nicht nur CREB (cAMP response element binding protein) gehört, sondern auch ATF1 (activating transcription factor 1) und CREM (CRE modulator protein) (Foulkes und Sassone-Corsi, 1996; Walton and Dragunow, 2000). Das CRE hat die palindromische Consensus-Sequenz TGACGTCA und wurde ursprünglich im Somatostatin-Promotor identifiziert (Sassone-Corsi, 1995; Montminy, 1997). CREB (43-kD), das zu der basic-domain-leucine-zipper (bZip) Transkriptionsfaktorenklasse gehört, ist ein kernständiger Transkriptionsfaktor, welcher durch eine Vielzahl von extrazellulären Botenstoffen und Wachstumsfaktoren reguliert wird.



Das CREB Protein kommt in drei gespleißten Isoformen vor (alpha, beta, und delta), welche verschiedene Eigenschaften und bekannte Regulationen haben. CREB ist an der transkriptionellen Kontrolle zahlreicher Gene (als Homodimer) beteiligt und viele dieser Gene werden ziemlich rasch exprimiert, wenn die cytoplasmatische cAMP- oder  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration sich erhöht (Walton and Dragunow, 2000). CREB/ATF Protein besteht aus folgenden funktionellen Domänen: einer Leucinezipper-Domäne, welche Dimerization vermittelt, einer basischen DNA-bindenden Domäne und der transkriptionsaktivierenden Domäne, welche wichtige Phosphorylierungsstellen besitzt (Walton und Dragunow, 2000). Sowohl CREB-327 als auch das 14 Aminosäuren längere CREB-341 werden durch die Phosphorylierung einer bestimmten Aminosäure, das Serin-119 im CREB-327 bzw. das Serin-133 im CREB-341, aktiviert. Die transkriptionelle Aktivität von CREB ist von seiner Phosphorylierung an Ser-119 (in CREB-327) abhängig und dies geschieht durch die Proteinkinase A (Gonzalez und Montminy, 1989), sowie durch andere Kinasen wie die  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierte Calmodulin-Kinase, die ribosomale S6 Kinase 2, oder die mitogen-aktivierte protein-kinase-aktivierte Proteinkinase 2 (Beiter-Johnson und Millhorn, 1998). Der Mechanismus, durch den die Phosphorylierung von CREB zu einer Steigerung der transkriptionellen Aktivität CREB-regulatorischer Gene führt, ist unklar; jedoch wird angenommen, daß diese Modifikationen konformationelle Änderungen induzieren, welche CREB von einer inaktiven zu einer aktiven Form konfigurieren (Brindle et al., 1993; Gonzalez et al., 1991). Damit kann phospho-CREB die Transkription durch Rekrutierung von Co-Aktivatoren wie CREB-binding Protein (CBP) erhöhen (Chrivia et al., 1993; Kwok et al., 1994). Chronischer Streß ist in der Ätiologie der affektiven Depressionen verwickelt (Redmond und Huang, 1979; Charney et al., 1993; Abercrombie und Zigmond, 1995). Viele Streß-Tiermodelle wurden angewandt, um ein Tiermodell der endogenen Depression zu produzieren (Katz, 1981). Antidepressiva waren in der Lage, chronisch Streß-induzierte Verhaltensdefizite und physiologische Änderungen reversibel zu beeinflussen (Katz et al., 1981). Diese Befunde legten nahe, daß der unvorhersehbare chronische Streß (Katz, 1981) bezüglich des Verhaltens, der Physiologie und auch der Pharmakologie Ähnlichkeit zu der klinischen Krankheit zeigt und als Tiermodell der humanen Depression nützlich ist. Die auslösenden Faktoren, die in einigen Tiermodellen der Depression eingesetzt werden, wie elektrischer Schock, kalter Schwimmtest, Heiß- und Schüttel-Test (Katz, 1981; Katz. et al.,

1981), haben kaum Ähnlichkeit zu Ursachen, die die humanen Depressionen induzieren. Es ist bekannt, daß die Depressions-Entwicklung bei Menschen von emotionalen negativen Stress-Faktoren abhängt (Kudryavtseva et al., 1991). Bei dem hier angewandten Tiermodell der Depression (siehe 2.29) wurden sozial signifikante Faktoren, wie Zusammenleben der Mäuse, sich gegenseitig sehen, hören, riechen und gegeneinander kämpfen, berücksichtigt. Dies führte zu der Entstehung von dominanten und submissiven Mäusen. Diese waren dem vermuteten sozialen (emotional negativ) Streß, der den Depressionen bei den Menschen ähnlich sein könnte (Valdman und Poshivalov, 1980; Kudryavtseva, 1987; Kudryavtseva, 1988; Kudryavtseva und Bakshtanovskaya, 1988; Kudryavtseva und Bakshtanovskaya, 1989; Kudryavtseva und Sitnikov, 1988; Kudryavtseva et al., 1991) ausgesetzt.

In der vorliegenden Dissertation wurde auf der Grundlage der Arbeitshypothese gearbeitet, daß der Transkriptionsfaktor CREB oder eng verwandte Proteine (ATF1, CREM $\tau$ ) Änderungen der Genexpression in Antwort auf Antidepressiva vermitteln. Dazu sollte untersucht werden, ob Antidepressiva die CRE-vermittelte Transkription in vivo verändern. Für diesen Zweck sollten 4xCRE-Luc-transgene Mäuse hergestellt werden, die das Luciferase-Reportergen unter der Kontrolle von 4 Kopien eines CREs tragen. Da Antidepressiva typischerweise nur bei depressiven Patienten stimmungsaufhellend wirken, nicht jedoch bei Gesunden, sollte an einem Tiermodell der Depression untersucht werden, ob die CRE-vermittelte Transkription in diesem Tiermodell der Depression verändert ist und ob diese Veränderung durch Behandlung mit Antidepressiva korrigiert werden kann. Zu diesem Zweck wurden die 4xCRE-Luc-transgenen Mäuse einem dauerhaften unvermeidbaren psychosozialen Streß (Depressionsmodell) ausgesetzt. Die dem psychosozialen Streß ausgesetzten Tiere wurden daraufhin dauerhaft (3 Wochen) mit dem Antidepressivum Imipramin behandelt. Außerdem wurde die Wirkung einer akuten Imipramin-Behandlung bzw. dauerhafter Imipramin-, Desipramin- und Fluoxetin-Behandlung auf die CRE-vermittelte Transkription in nicht dem psychosozialen Streß ausgesetzten Tieren untersucht. Zur Messung der CRE-vermittelten Transkription in vivo wurde das jeweilige Gewebe präpariert, homogenisiert und Reportergen-Aktivität gemessen.

**2. Material und Methoden**

Die in der vorliegenden Arbeit benutzten Geräte und Materialien, welche hier nicht aufgeführt sind, werden in den entsprechenden Methodenkapiteln beschrieben. Die unter den Punkten 2.2 bis 2.31 beschriebenen Methoden orientieren sich, wenn nicht anders angegeben, an Vorschriften, die dem Laborhandbuch von Sambrook et al. (1989) entnommen wurden.

**2.1. Chemikalien**

Chemikalien, die nicht gesondert aufgeführt sind, wurden von der Firma Merck (Darmstadt) bezogen und waren analysenrein.

Imipramin-HCl	Sigma, München
Fluoxetin-HCL	Sigma, München
Desipramin-HCl	Sigma, München
Veratridin	Sigma, München
Tetrodotoxin(TTX)	Roth, Karlsruhe
BSA	Sigma, München
Luciferin	Sigma, München
Luciferase Assay Kit/	Berthold Detection Systems
Substrat A/B	Pforzheim
Äthanol	Baker, Deventer, NL
Agarose	GIBCO/BRL, Karlsruhe
Ammoniumacetat	Fluka, Neu-Ulm
Aprotinin	Sigma, München
ATP	Boehringer, Mannheim
Bacto-Agar	Difco, Detroit, USA
Bio-Rad Protein Assay	Bio-Rad, München
Bromphenolblau	Sigma, München
Chloroform	Baker Deventer, NL
Dextransulfat $M_w \sim 500.000/\eta = 0,5$	Pharmacia, Freiburg

DEPC	Sigma, München
Dimethylformamid	Sigma, München
Dithiothreitol	Sigma, München
DMEM-Medium	Biochrom, Berlin
10x Earle's (EBSS, flüssig, ohne NaHCO <sub>3</sub> )	GIBCO/BRL, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Sigma, München
Formaldehyd (37%)	Fluka, Neu-Ulm
Formamid	Fluka, Neu-Ulm
Glycerin	GIBCO/BRL, Karlsruhe
10x Hank's	GIBCO/BRL, Karlsruhe
40x HEPES	GIBCO/BRL, Karlsruhe
Hyaluronidase	Boehringer, Mannheim
Hypnodil	Sigma, München
Intergonan (PMS)	Vemie, Kempen
Klenow-Polymerase	Pharmacia, Freiburg
Leupeptin	Sigma, München
Mineralöl	Fisher Scientific, Fair Lawn, USA
37,5x Natriumhydrogencarbonat	GIBCO/BRL, Karlsruhe
300x Natriumpyruvat	GIBCO/BRL, Karlsruhe
NTP	Boehringer, Mannheim
dNTP	Boehringer, Mannheim
Orange G	Sigma, München
PBS	Biochrom, Berlin
Penicillin G K-Salz	Sigma, München
Pepstatin	Sigma, München
Phenol	GIBCO/BRL, Karlsruhe
PMSF	Sigma, München
Predalon (hCG)	Organon, Oberschleißheim
Proteinase K	Boehringer, Mannheim
Restriktionsenzyme	Boehringer, Mannheim

	GIBCO/BRL, Karlsruhe
	New England Biolabs
	Pharmacia, Freiburg
SDS	Serva, Heidelberg
Streptomycinsulfat	Sigma, München
Taq-Polymerase	Amersham, Braunschweig
T4-DNA-Ligase	Boehringer, Mannheim
X-Gal	Biomol, Ilvesheim

## **2.2 Puffer und Lösungen**

Die angegebenen Lösungen wurden nach Sambrook et al. (1989) angesetzt; die Chemikalien wurden in bidestilliertem Wasser gelöst und bei Bedarf autoklaviert oder sterilfiltriert (siehe 2.5).

Denaturierungslösung (FISH)	70% Formamid (deion.) 2x SSC pH 7,0
Denhardt's Lösung	1% Rinderserumalbumin 1% Polyvinylpyrrolidin 1% Ficoll 400
dNTP-Mix	300 µM dATP 300 µM dCTP 300 µM dGTP 300 µM dTTP
Ethidiumbromid	10 mg/ml H <sub>2</sub> O
Färbelösung	1 mg/ml X-Gal

	5 mM $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 5 mM $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ 2 mM $\text{MgCl}_2$ gelöst in PBS (1x)
hCG-Lösung	1 Ampulle Predalon (500 IU) auf 10 ml Ringer-Lösung
Hyaluronidase-Lösung	10 mg/ml Hyaluronidase Frakt. IV-S (bov. Testis) in M 2- Medium
Hybridisierungslösung I	50% Formamid 5x SSC 1x Denhardt's Lösung 5% Dextransulfat 31 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 0,25% SDS
Klenow-Puffer (10x)	500 mM Tris-HCl pH 7,5 200 mM DTT 50 mM $\text{MgCl}_2$
Lysis-Puffer I	50 mM Tris-HCl pH 8,0 100 mM EDTA 0,5% SDS
Lysis-Puffer II	50 mM Tris-HCl pH 8,0 20 mM NaCl 1 mM EDTA 1% SDS

Master-Mix	20% Dextransulfat 2x SSC
Mikroinjektionspuffer	10 mM Tris pH 7,4 0,2 mM EDTA
Neutralisierungslösung	1 M Tris pH 5,5 3 M NaCl
Paraformaldehyd (4%)	4 g Paraformaldehyd auf 100 ml mit PBS (1x)
PBS-Puffer (1x)	140 mM NaCl 2,5 mM KCl 8,1 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1,5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
Der pH-Wert wurde mit NaOH auf 7,4 eingestellt	
PMS-Lösung	1 Ampulle Intergonan (1000 IU) auf 20 ml Ringer-Lösung
Ringerlösung	9,00 g NaCl 42 g KCl 25 g CaCl <sub>2</sub> auf 1000 ml H <sub>2</sub> O
SSC-Puffer (20x; pH 7,0)	3 M NaCl 0,3 M Trinatriumcitrat
Stop-Mix I	0,01 M EDTA 0,01% Orange G 15% Ficoll 400

Stop-Mix 6x	30% Glycerin 0,25% Bromphenolblau 0,25% Xylencyanol
TAE-Puffer (50x; pH 7,8)	2 M Tris (pH 8,0) 1 M Natriumacetat 50 mM EDTA (pH 8,0)
TBE-Puffer (5x)	445 mM Tris-HCl pH 8,2 445 mM Borsäure 10 mM EDTA
TE-Puffer (10x)	100 mM Tris-HCl pH 8,0 10 mM EDTA
TNE-Puffer	10 mM Tris-HCl, pH 8,0 100 mM NaCl 1 mM EDTA
Waschlösung I	2x SSC 0,1% SDS
Waschlösung II	0,2x SSC

### **2.3 Medien**

DMEM-Medium	DMEM-Pulver    13 g NaHCO <sub>3</sub> 3 g H <sub>2</sub> O ad 1000 ml
-------------	--

Die angegebene Menge DMEM-Pulver wurde zunächst in H<sub>2</sub>O gelöst und sterilfiltriert.



M 2-Medium	5 ml 10x Hank's 1,25 ml 40x HEPES 165 µl 300x Na-Pyruvat 250 µl 1M NaOH 500 µl Penicillin (6 g/l) / Streptomycin (5 g/l) 200 mg BSA auf 50 ml mit Ampuwa
M 16-Medium	1 ml 10x Earle's 270 µl 37,5x NaHCO <sub>3</sub> 33 µl 300x Na-Pyruvat 100 µl Penicillin (6 g/l) / Streptomycin (5 g/l) 40 mg BSA auf 10 ml mit Ampuwa

## **2.4 Gebrauchswaren**

Nicht gesondert aufgeführte Gebrauchswaren wurden von den Firmen Schütt und Krannich, Göttingen, bezogen.

Borosilikatglaskapillaren	Hilgenberg, Malsfeld
Einmalfilter Minisart NML	Sartorius, Göttingen
Einmalpipetten	Falcon, Becton, USA
Hybond C - Nitrocellulose	Amersham, Braunschweig
Mikroinjektionskapillaren	Clark, Pangbourne Reading, UK

Einmalfilter HY 0.45 µm	Millipore, Molsheim
Petrischalen	Falcon, Becton, USA
Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
Röntgenfilme	Amersham, Braunschweig
Zellkulturflaschen	Greiner, Nürtingen
Zentrifugengefäße	Beckman, München

### **2.5 Sterilisation**

Lösungen, Puffer und Medien wurden bei Bedarf entweder für 20 Minuten bei 120°C und  $1,3 \times 10^5$  Pa autoklaviert oder mit entsprechenden Einmalartikeln sterilfiltriert. Gebrauchswaren wurden ebenfalls autoklaviert oder bei 220°C für 12 Stunden hitzesterilisiert.

### **2.6 Apparatur zur Mikroinjektion**

Die Mikroinjektionsanlage bestand aus folgenden Komponenten:

Invers-Mikroskop mit Nomarski-Optik (Zeiss, Göttingen)

Mikromanipulator für die Injektionspipette und Mikroinjektor mit dazugehörigem Kompressor (Eppendorf, Hamburg)

Mikromanipulator für die Haltepipette und Mikrometerspritze (Bachofner, Reutlingen)

Horizontaler Pipettenpuller (Bachofer, Reutlingen)

Mikroschmiede (De Fonbrune, Bachofer, Reutlingen)

## **2.7 Präparation von Nukleinsäuren**

### **2.7.1 Isolierung genomischer DNA aus Gewebe**

Mit der folgenden Methode nach Hogan et al. (Hogan et al., 1986) ließ sich DNA aus Schwanzgewebe von Mäusen gewinnen. Dazu wurde ca. 1 cm einer Schwanzbiopsie in 700 µl Lysis-Puffer, versetzt mit 35 µl Proteinase K-Lösung (10 mg/ml H<sub>2</sub>O), unter Schütteln bei 55°C über Nacht inkubiert. Es folgten zwei Extraktionsschritte mit jeweils gleichem Volumen Phenol bzw. Phenol/Chloroform (1:1), wobei der Überstand unter Vermeidung von Interphase-Debris mit abgeschnittenen Eppendorf-Spitzen in neue Eppendorf-Cups transferiert wurde. Nach Zugabe von 0,1 Vol 3 M Natriumacetat (pH 6,0) und 1 Vol Äthanol (100%) und kurzem Schütteln fiel die DNA bereits sichtbar aus. Nach kurzem Abzentrifugieren und Entfernen des Überstands wurde zweimal mit 1 ml 70%igem Äthanol gewaschen und anschließend im Speedvac kurz getrocknet. Die DNA wurde in 80-100 µl 1xTE-Puffer über Nacht gelöst, der Ertrag lag bei 80-150 µg.

### **2.7.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren**

Durch Messung der Absorption von gelösten Nukleinsäuren bei bestimmten Wellenlängen mittels eines Spektralphotometers (Hewlett Packard Typ 8452 A) konnte deren Konzentration berechnet und auf ihre Reinheit rückgeschlossen werden.

Es wurden folgende Meßpunkte aufgenommen:

320 nm: Absorptionsminimum für DNA und RNA

280 nm: Absorptionsmaximum für Proteine

260 nm: Absorptionsmaximum für DNA und RNA

230 nm: Absorptionsmaximum für aromatische Substanzen und Salze

Durch Einsetzen der Meßwerte in die Formel

$$c = (E_{260} - E_{320}) \times f \times K$$

$c$  = Konzentration ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )  
 $E_{260}$  = Meßwert bei 260 nm  
 $E_{320}$  = Meßwert bei 320 nm  
 $f$  = Verdünnungsfaktor  
 $K$  = Konzentrations-  
koeffizient ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )

unter Berücksichtigung der verschiedenen Konzentrationskoeffizienten für:

-doppelsträngige DNA: 0,05  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$

-RNA/einzelsträngige DNA: 0,04  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$

-Oligonukleotide: 0,03  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$

erfolgte dann die Konzentrationsberechnung. Durch die Ermittlung des Quotienten  $\text{OD}_{260}:\text{OD}_{280}$  ließ sich zudem die Reinheit der Präparation beurteilen; er sollte bei DNA-Lösungen zwischen 1,6-1,8 und bei RNA-Lösungen zwischen 1,8-2,0 liegen.

## **2.8 Enzymatische Modifikationen von Nukleinsäuren**

### **2.8.1 DNA-Restriktionsverdau**

DNA-Moleküle lassen sich durch bakterielle Restriktionsendonukleasen, die für sie spezifische Nukleotidsequenzen (4-8 bp) erkennen, spalten. Beim Restriktionsverdau machten die Restriktionsenzyme und die von den Herstellern mitgelieferten 10xRestriktionspuffer jeweils 10% des Gesamtvolumens aus, die restlichen 80% bestanden aus der DNA-Lösung und Wasser. Vektor- bzw. Vektor/Insert-DNA (1-10 µg) wurde normalerweise in einem Reaktionsvolumen von 20-30 µl mit einem 2-5fachen Verhältnis  $\text{Units}_{\text{Enzym}}:\mu\text{g}_{\text{DNA}}$  für 2 Stunden bei entsprechender Temperatur inkubiert. Genomische DNA (10-20 µg) wurde in einem Reaktionsvolumen von 100 µl mit einem 10fachen Enzym-Überverdau bei entsprechender Temperatur über Nacht inkubiert. Der Verdau wurde durch die Zugabe von 0,1-0,2 Vol Stop-Mix I abgestoppt und seine Vollständigkeit auf einem Agarosegel überprüft.

## **2.9 Radioaktive Markierung von Nukleinsäuren**

### **2.9.1 Markierung von DNA durch "random priming"**

Mittels des von Feinberg und Vogelstein (1983) entwickelten Verfahrens, wobei einzelsträngige DNA, vergleichbar der cDNA-Synthese, mit einem Oligoprimergemisch, entsprechenden dNTPs und Klenow-Enzym zu einem doppelsträngigen Fragment ergänzt wird, lassen sich DNA-Sonden von hoher spezifischer Aktivität ( $5 \times 10^9$  dpm/µg DNA) erzeugen ("Megaprime<sup>TM</sup>"-Kit Amersham, Braunschweig). Beim "Megapriming" wurden 25-50 ng DNA, x µl H<sub>2</sub>O (auf 50 µl Endvolumen berechnet) und 5 µl Primer-Solution [d(N)<sub>9</sub>] im Wasserbad gekocht und anschließend für 2 Minuten auf Eis gestellt. Nach kurzem Abzentrifugieren wurden 10 µl Reaktionspuffer, 5 µl [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-dCTP (50 µCi) und 2 µl Klenow-Enzym addiert und 1-2 Stunden bei RT inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 3 µl 0,5 M EDTA (pH 8,0) abgestoppt, zur Fällung der DNA wurden 11 µl tRNA (Hefe; 10 mg/ml), 11 µl 3 M Natriumacetat (pH 6,0), 35 µl H<sub>2</sub>O und 300 µl Äthanol (100%) hinzugefügt und für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Nach einer Zentrifugation von 15 Minuten bei 4°C und 12000 UpM wurde das DNA-Pellet mit 70%igem Äthanol gewaschen, kurz bei 37°C getrocknet und in 200 µl H<sub>2</sub>O gelöst. Die radioaktive Markierung wurde durch Messung von 1 µl Probe, aufgenommen in 4 ml Szintillationsflüssigkeit, in einem  $\beta$ -Szintillationszähler (Beckmann LS 1801, München) überprüft. Die hier verwendete Sonde wurde aus dem

Plasmid pT81 (Nordeen, 1988; Oetjen et al., 1994) mit XbaI geschnitten und mit dem Easy Pure Kit gereinigt (DNA Purification Kit Easy Pure, Biozym).

### **2.10 Radiochemikalien**

Von ICN Biomedicals GmbH (Meckenheim) wurden die radioaktiv markierten Nukleotide ( $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ )-dCTP (spezifische Aktivität: 3000 Ci/mmol) bezogen.

#### **2.10.1 Bestimmung der Radioaktivität**

Die Radioaktivität  $^{32}\text{P}$ -markierter Sonden wurde mit Hilfe eines Szintillationszähler (Beckmann LS 1801, München) nach Angaben des Herstellers bestimmt. Hierzu wurden 1  $\mu\text{l}$  des markierten Oligonukleotids in 4 ml Szintillations-Flüssigkeit (Quicksafe A, Zinser Analytic, Frankfurt) gemessen.

#### **2.10.2 Autoradiographie**

Die Autoradiographie von Nitrocellulose-Filter des Southern Blots ( $^{32}\text{P}$ -markierte DNA) erfolgte in Röntgen-Kassetten mit Verstärkerfolie (Kodak X-Omatic, Stuttgart) unter Verwendung von Röntgenfilmen (Hyperfilm MP, Amersham, Braunschweig). Die Autoradiographie erfolgte bei  $-80^\circ\text{C}$  für 1-14 Tage. Nach der Exposition wurden die autoradiographierten Filme für 2-3 Minuten in Röntgenentwickler (LX 24, Kodak, Stuttgart) inkubiert und danach im Röntgenfixierbad (AL 4 Kodak, Stuttgart) fixiert, mit Wasser gewaschen und anschließend getrocknet.

### **2.11 Gelelektrophorese, Isolierung und Transfer von Nukleinsäuren**

#### **2.11.1 Horizontale Agarose-Gelelektrophorese (Sambrook et al., 1989)**

Für die Überprüfung von Restriktionsverdauungen genomischer DNA und die Größenkontrolle von PCR-Fragmenten ist diese Art von nicht-denaturierender

Elektrophorese besonders geeignet. Es wurden Gele mit 30-100 ml Vol in einer Horizontalkammer (Bio-Rad Gels; München) mit 1x TAE-Puffer als Gel- und Laufmittel verwendet. In Abhängigkeit von dem aufzutrennenden Fragmentbereich (Sambrook et al., 1989) variierte die Agarose-Konzentration zwischen 0,8-2,5% (w/v). Es wurde für die Gele bei genomischer DNA 0,8% w/v, und bei PCR-Kontrollen 1% w/v Agarose verwandt. Hierzu wurde die Agarose in 1xTAE-Puffer in einem Mikrowellenherd aufgeköcht, nach kurzem Abkühlen mit EtBr (siehe 2.2) versetzt und in einen Gelträger gegossen. Zur Beschwerung der Proben, und zur Markierung der Laufront im Gel wurden die Proben vor dem Auftragen mit 1/6 Vol 6x Stop-Mix versetzt. Die Gelelektrophorese erfolgte bei einer konstanten Spannung von 100 V. Nach der Elektrophorese wurden die Gele mit Hilfe eines UV-Transilluminators (254 oder 366 nm) angeschaut und soweit erforderlich mit einer Polaroidkamera oder einer Geldokumentationanlage photographiert (siehe 2.13).

### **2.11.2 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen**

Der verwendete "QIAEX gel extraction kit" (Qiagen, Düsseldorf) ermöglicht mit einem hohen Wirkungsgrad die Aufreinigung von DNA-Fragmenten (45 bp - 45 kb) aus TAE-Agarosegelen. Dabei bindet die DNA bei hoher Salzkonzentration an eine spezielle Silikatgel-Matrix, während Proteine und andere Verunreinigungen nicht gebunden werden; die DNA wird dabei nicht geschert. Das entsprechende DNA-Fragment wurde aus einem TAE-Agarosegel unter UV-Licht mit einem Skalpell herausgeschnitten, gewogen und mit der 3fachen v/w Menge QX 1 Puffer (3 M Na-Jodid; 4 M NaClO<sub>4</sub>) versetzt. Dann wurde die Probe solange geschüttelt, bis die Agarose sich gelöst hatte. Es wurden 10 µl QIAEX-Matrix hinzugegeben, und nach kurzem Vortexen wurde die Probe für 10 Minuten bei 50°C inkubiert. Nach einer Zentrifugation von 1 Minute bei RT und 12000 UpM (Eppendorf 5415 C) wurde das Pellet 2x mit 500 µl des Hochsalzpuffers QX 2 gewaschen, um restliche Agarose zu entfernen. Darauf folgten 2 Waschschrte mit jeweils 500 µl kaltem QX 3-Puffer, um die Salze zu entfernen. Schließlich wurde das Pellet kurz getrocknet, es wurden 20 µl Ampuwa addiert und der Ansatz unter Schütteln 5 Minuten bei RT inkubiert. Nach dieser Elution und einem erneuten Zentrifugationsschritt befand sich die DNA im Überstand, der in ein neues Cup transferriert wurde. Der Elutionsvorgang wurde wiederholt und die

Überstände gepooled. Qualität und Konzentration der DNA wurden auf einem Gel abgeschätzt.

### **2.11.3 Transfer von DNA aus Agarosegelen**

Durch das Kapillarblotting nach Southern (1975) werden elektrophoretisch aufgetrennte Nukleinsäuren auf Nitrocellulose- oder Nylon-Membranen übertragen. Nach der Elektrophorese wurde das Gel zwecks Bildung von DNA-Einzelsträngen für 30 Minuten in 500 ml Denaturierungslösung gegeben und danach mit der gleichen Menge Neutralisierungslösung für 45-60 Minuten unter gelegentlichem Schütteln neutralisiert. Die Blotting-Apparatur wurde aus einer mit 20x SSC gefüllten Fotoschale und 2 Lagen Whatmanpapier, die in die Lösung eintauchten, konstruiert. Nach Beendigung der Neutralisierung wurde das Gel auf das Whatmanpapier gelegt und die Ränder mit Kunststoffolie abgedichtet. Nach vorherigem Einweichen in 2x SSC wurden jetzt noch auf das Gel die Nitrocellulose (Hybond<sup>TM</sup>-C extra; Amersham, Braunschweig) und 2 Lagen Whatmanpapier luftblasenfrei aufgelegt und mit 2 Paketen Einmal-Handtüchern und einem Gewicht von ca. 500 g beschwert. Nach 1-2 Tagen wurde der Blot abgebaut, der Nitrocellulose-Filter markiert, vom Gel abgezogen und kurz in 2x SSC gewaschen, um Agarosereste zu entfernen. Schließlich folgte die Fixierung der DNA auf dem Filter entweder durch Backen des Filters im Vakuumofen für 2 Stunden bei 80°C oder durch UV-Crosslinking (UV Stratalinker 1800, Stratagene; Auto-Crosslink-Programm).

### **2.12 Hybridisierung radioaktiv markierter Sonden an membrangebundene Nukleinsäuren**

Das fixierte Nitrocellulose-Filter wurde für 15 Minuten in 2x SSC eingelegt und dann in eine Hybridisierungsröhre überführt. Dazu wurden 15 ml Hybridisierungslösung I und 250 µl hitzedenaturierte Lachsspermien DNA (10 mg/ml) gegeben; der Filter wurde dann zur Vorhybridisierung 3-4 Stunden bei wiederum von der Anwendung abhängigen Temperaturen von 50°C-72°C im Rollerofen inkubiert. Kurz vor Beendigung der Vorhybridisierung wurde die radioaktiv markierte Sonde (siehe 2.9.1) zusammen mit 250 µl Lachsspermien-DNA für 5



Minuten im Wasserbad gekocht, für 2 Minuten auf Eis gestellt und danach in das Hybridisierungsröhrchen pipettiert. Die Hybridisierung lief dann bei der gleichen Temperatur über Nacht, am nächsten Tag wurde der Filter wie folgt gewaschen: nach Abgießen der Hybridisierungslösung wurde der Filter für 15 Minuten in 500 ml 2x SSC bei RT eingelegt und danach in die Waschlösung I überführt, deren Temperatur ca. 2-3°C unter der Hybridisierungstemperatur lag. Ließ sich die per Handmonitor (Berthold, Bad Wildbad) meßbare Hintergrundstrahlung des Filters nicht auf 1-2 Bq/cm<sup>2</sup> reduzieren, wurde der Filter bei gleicher Temperatur in der stringenten Waschlösung II gewaschen. Nach Lufttrocknung für ca. 1 Stunde wurde der Filter in Haushaltsfolie eingeschweißt und in eine Röntgenfilmkassette (Kodak X-Omatic, Stuttgart) eingeklebt. Nach Auflegen eines Röntgenfilms (Hyperfilm MP, Amersham, Braunschweig) wurde der Filter je nach Signalstärke für wenige Stunden bis zu mehreren Tagen bei -80°C exponiert.

### **2.13 Nachweis von Nukleinsäuren im analytischen Maßstab**

#### **2.13.1 Ethidiumbromidfärbung in Agarosegelen**

Der Fluoreszenzfarbstoff EtBr (siehe 2.2) interkaliert zwischen den Basen der Nukleinsäuren, die den Farbstoff akkumulieren und damit im UV-Licht durch dessen Fluoreszenz sichtbar werden. Der Zusatz des EtBr erfolgte direkt bei Herstellung des Gels zur flüssigen Agaroselösung (siehe 2.11.1). Die Dokumentation der Gele erfolgte unter UV-Licht von 254 oder 366 nm (UV-Kontaktlampe Chromo 42, Vetter GmbH, Wiesloch) durch Photographieren mit einer Sofortbildkamera (Quick, Shooter IBI; USA; Polaroidfilm Typ 667, Polaroid-Cooperation, Cambridge, USA) oder mit Hilfe einer Geldokumentationsanlage (Herolab E.A.S.Y., Wiesloch).

### **2.14 Amplifikation von spezifischen DNA-Fragmenten und Transkripte mittels der "Polymerase Chain Reaction" (PCR)**

Durch die PCR-Methode können kleinste DNA-Mengen exponentiell amplifiziert werden, so daß nach der PCR molekularbiologische Techniken wie Markierung oder Sequenzierung

spezifischer DNA-Fragmente, für die mehr Ausgangsmaterial benötigt wird, durchgeführt werden können. Eine typische PCR, für die neben einer thermostabilen DNA-Polymerase sequenzspezifische Oligonukleotid-Primer erforderlich sind, besteht aus der Wiederholung von 30-40 Zyklen, die jeweils die 3 Schritte: Denaturierung der DNA, Anlagerung der Oligonukleotid-Primer und Elongation der DNA-Stränge beinhalten. Dadurch wird die spezifische DNA-Sequenz um einen Faktor  $> 10^6$  vermehrt, wodurch eine weitere Bearbeitung möglich wird.

### **2.14.1 PCR an genomischer DNA**

Für die PCR an genomischer DNA wurde ca. 0,5 µg Template-DNA eingesetzt. Da die Reaktion äußerst anfällig für Kontaminationen ist, wurden die Eppendorfgefäße einer UV-Bestrahlung unterzogen (Stratalinker, Auto-Crosslink-Programm). Eine typische PCR wurde wie folgt zusammenpipettiert:

- x µl Template-DNA
- 5 µl Taq-Polymerase-Puffer (10x; Amersham, Braunschweig)
- 8 µl dNTP-Mix (je 300 µM; Boehringer, Mannheim)
- 2,5 µl "upstream"-Primer (25 pmol)
- 2,5 µl "downstream"-Primer (25 pmol)
- 0,5 µl Taq-Polymerase (4,5 U/µl; Amersham, Braunschweig)
- x µl H<sub>2</sub>O
- 50 µl Gesamtvolumen

Für die PCR-Reaktionen wurde ein Biometra TRIO-Thermoblock mit Deckelaufsatz (110°C) eingesetzt.

- 1x Denaturierung bei 95°C für 10 Minuten
- dann 30x:
  - Denaturierung bei 94°C für 1 Minute
  - Annealing bei 58°C für 1 Minute

Extension bei 72°C für 2 Minuten

(5 Sekunden Verlängerung bei jedem Zyklus)

1x Extension bei 72°C für 5 Minuten

Nach der PCR wurde ein Aliquot des Ansatzes auf einem horizontalen Agarosegel (siehe 2.11.1) analysiert.

### **2.14.2 PCR aus Gewebe**

Zur Überprüfung der Transgenität bei Mäusen war es möglich, eine kleine Gewebeprobe von Ohr oder Schwanz nach kurzer Aufarbeitung in einer PCR einzusetzen. Dazu wurde das Gewebe nach der Biopsie in 20 µl Lysis-Puffer II (UV-sterilisiert) aufgenommen und nach Hinzufügen von 1 µl Proteinase K-Lösung (20 µg/µl) unter gelegentlichem Vortexen für 30 Minuten bei 55°C inkubiert. Danach wurde der Ansatz auf 200 µl Gesamtvolumen mit Ampuwa aufgefüllt und für 5 Minuten gekocht. In der PCR (siehe 2.14.1) wurde schließlich 1 µl des Ansatzes als Template eingesetzt.

### **2.14.3 Verwendete PCR Primer**

#### **Luc-up**

5'-CGC CAT TCT ATC CTC TAG AGG-3'

#### **Luc-down**

5'-CTG ACG CAG GCA GTT CTA TGC-3'

#### **mur-betaglobin-up**

5'-CCA ATC TGC TCA CAC AGG ATA GAG AGG GCA GG-3'

**mur-betaglobin-down**

5'-CCT TGA GGC TGT CCA AGT GAT TCA GGC CAT CG-3'

**2.15 Bestimmung der Proteinkonzentration**

Um die Ergebnisse miteinander vergleichen zu können, war es nötig, die Proteinkonzentration der einzelnen Gewebeextrakten zu ermitteln. Dies wurde nach der Methode von Bradford (1976) mit Hilfe des Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad, München) durchgeführt. Der Bio-Rad-Farbstoff wurde dabei 1:5 mit H<sub>2</sub>O verdünnt und über Minisart-Einmalfilter (0,2 µm; Sarstedt, Göttingen) filtriert; dann wurden jeweils 280 µl des Farbstoffs mit 20 µl eines Proteinstandards bzw. 20 µl einer Probe in einer Mikrotiterplatte gemischt. Die Proteinstandardlösung (10 mg/ml) wurde aus Rinderserumalbumin (BSA) hergestellt, die Eichreihe umfaßte Konzentrationen von 0-20 µg/20 µl. Die Proben wurden vor Einsatz in den Assay 1:20 verdünnt, so daß sich aus der Eichkurve direkt die Konzentration µg/µl ablesen ließ (Kinetic microplate reader, Molecular Devices, MWG-Biotechnology; Soft max Programm). Die Messungen erfolgten als 3fach-Bestimmungen in einem Microplate Reader Type 450 (Bio-Rad, München) bei 550 nm.

**2.16 Art und Herkunft der verwendeten Mauslinien****2.16.1 Mauslinien**

Mäuse der Stämme NMRI und CB6F1 wurden von der Firma Charles River Wiga (Sulzfeld) oder aus dem institutseigenen Tierstall bezogen und bei allen Versuchen wurden nur die männlichen Tiere eingesetzt. Die Tiere wurden in einem Hell-Dunkel-Rhythmus von jeweils 12 Stunden bei einer Temperatur von 22°C gehalten. Die Mäuse hatten freien Zugang zu Futter und Wasser. Unabhängige Linien der hergestellten 4xCRE-Luc-transgenen Mäuse sind als 32.3, 32.7 und 38.1 bezeichnet.

**2.17 Methoden zur Herstellung der transgenen Mäuse 4xCRE-Luc**

Wird neue genetische Information in somatische Gewebe oder die Keimbahn der Maus eingeschleust, so werden die entstandenen Tiere als transgen bezeichnet (Palmiter und Brinster, 1985). Die dafür am häufigsten und am erfolgreichsten verwendete Methode ist die direkte Mikroinjektion von DNA in den Vorkern einer befruchteten Maus-Eizelle (Gordon et al., 1980). Derart behandelte Eizellen werden in die Eileiter pseudoschwangerer Mäuse reimplantiert; nach der Geburt wird der Wurf dann mittels DNA-Hybridisierung oder PCR auf Transgenität getestet. Die im folgenden beschriebenen Methoden orientieren sich an dem Handbuch von Hogan et al. (1986). Gebrauchsmaterialien wie OP-Besteck und Blockschälchen wurden mit einem für Zellkultur geeigneten Detergenz gespült und nach intensivem Nachspülen mit Wasser über Nacht hitzesterilisiert; die zum Oocyten-Transfer hergestellten Pasteurpipetten wurden ebenfalls hitzesterilisiert. Die Arbeiten zur Herstellung der transgenen Mäuse wurden von Herrn S. Beimesche mit meiner Mitarbeit durchgeführt.

### **2.17.1 Vasektomie**

Um bei weiblichen Mäusen den Zustand der Scheinschwangerschaft zu erzeugen, mußten diese mit sterilen Männchen verpaart werden. Die Sterilität wurde bei den Männchen durch eine Vasektomie herbeigeführt. Dazu wurden fertile CB6F1-Männchen (dunkle Fellfarbe) im Alter von 8-10 Wochen mit Hypnodil betäubt; pro 10 g Körpergewicht wurden 150 µl Hypnodil-Lösung (1:10 mit 0,9% NaCl verdünnt) intraperitoneal injiziert. Die Maus wurde auf den Rücken gelegt, der Bauch wurde mit 70%igem Äthanol desinfiziert, und in Höhe der Oberschenkel wurde der Bauchraum mit einem ca. 1,5 cm breiten Querschnitt geöffnet. Mit einer Pinzette wurde ein Hoden an dem anliegenden Fettpolster aus der Bauchhöhle gezogen; der Samenleiter ließ sich an dem parallel verlaufenden Blutgefäß identifizieren. Mit einer chirurgischen Nadel wurde doppelt genommene medizinische Seide durch das Mesenterium unterhalb des Samenleiters gezogen, und es wurden im Abstand von ca. 5 mm zwei Knoten gemacht. Zwischen diesen beiden Ligaturen wurde der Samenleiter mit einer Schere durchgetrennt. Nach Wiederholung der Prozedur mit dem anderen Samenleiter wurden die Hoden wieder in der Bauchhöhle orientiert, und die Häute wurden mit einer Pinzette aneinandergelegt und mit Wundklammern verschlossen. Der Schnitt wurde mit Wundpuder versorgt, und die Maus wurde bis zum Aufwachen auf eine Wärmeplatte (37°C) gelegt. Die

Sterilität des Männchens wurde nach ca. 10 Tagen durch Verpaarung mit 2 NMRI-Weibchen (weiße Fellfarbe) getestet.

### **2.17.2 Superovulation**

Um für die Mikroinjektionen die maximale Zahl fertilisierter Eizellen zur Verfügung zu haben, wird die Ovulation über die hormonelle Stimulierung der weiblichen Versuchstiere mittels PMS (wirkt als FSH-Analogon) und hCG (wirkt als LH-Analogon) synchronisiert. Unter natürlichen Umständen ovulieren Mäuse bei einem konstanten Hell-Dunkel-Rhythmus alle 4-5 Tage ungefähr 3-5 Stunden nach Einsetzen der Dunkelperiode. Das jeweilige Östrus-Stadium läßt sich dabei anhand der Vaginalschleimhaut nur bedingt sicher einordnen. Diese Unsicherheit läßt sich durch die Gabe von PMS und hCG bei gleichzeitiger Erhöhung der Ovulationsrate beseitigen. Die Hell-/Dunkelphasen im Stall waren 1:1 von 7-19 Uhr eingestellt. 3 Tage vor der Oocyten-Isolierung wurde 6-8 weiblichen NMRI-Mäusen zwischen 14-16 Uhr 100 µl PMS-Lösung (5 IU) intraperitoneal gespritzt. 46-48 Stunden später wurde den Tieren dann 100 µl hCG-Lösung (5 IU) injiziert, und jeweils 1-2 Weibchen wurden zu einem fertilen NMRI-Männchen in den Käfig gesetzt. Am darauffolgenden Morgen wurden die Weibchen auf einen Vaginalpfropf hin untersucht, der aus agglutiniertem Protein der Samenflüssigkeit des Männchens besteht und ein sicheres Indiz für eine vollzogene Verpaarung ist.

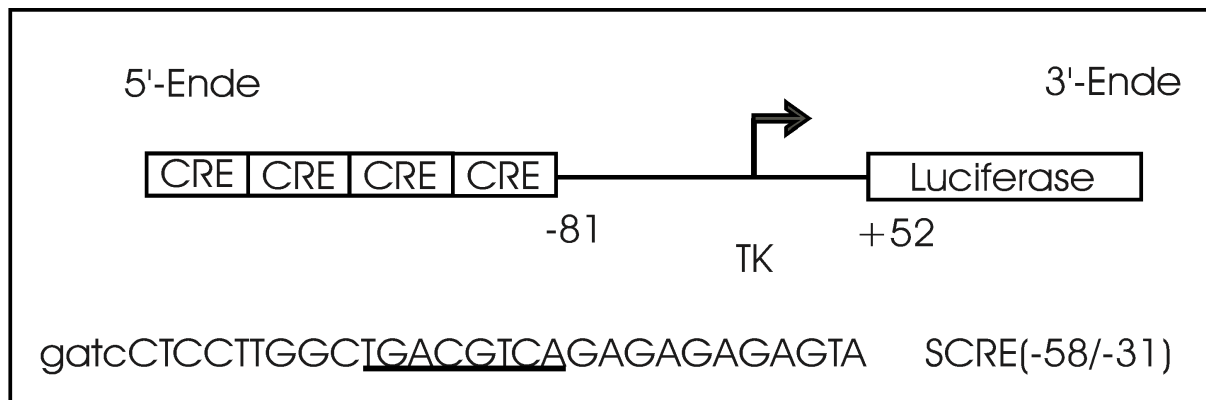
### **2.17.3 Gewinnung befruchteter Oocyten**

Erfolgreich verpaarte Weibchen wurden durch Genickbruch getötet. Nach Freilegung der Bauchhöhle wurden die Eingeweide zur Seite geschoben und ein Uterushorn vorsichtig mit der Pinzette vorgezogen. Nach Durchtrennung der Mesenterien wurde das Ovidukt mit einem Schnitt zwischen Ovidukt und Ovar und einem weiteren Schnitt im oberen Uterusbereich isoliert und in ein Blockschälchen mit 1 ml M 2-Medium (37°C) überführt. Mit dem anderen Ovar wurde ebenso verfahren; unter dem Stereomikroskop wurden jetzt die noch im Cumulus oophorus befindlichen Oocyten aus der Ampulle des Ovars isoliert, indem das Ovar mit einer Pinzette gegen den Boden des Blockschälchens gedrückt wurde und mit einer zweiten Pinzette

die Ampulle angeritzt wurde. Zur Entfernung der Cumuluszellen wurden 30 µl Hyaluronidase-Lösung addiert, und der Ansatz wurde für 1-2 Minuten auf der Wärmeplatte (37°C) inkubiert. Unter dem Stereomikroskop wurde die Freisetzung der Oocyten überprüft, dann wurden diese möglichst schnell mit Mundschlauch und daran angeschlossener Pasteurpipette (per Hand über dem Bunsenbrenner ausgezogen; hitzesterilisiert) in ein neues, mit vorgewärmtem M 2-Medium gefülltes Blockschälchen transferiert. Dieser Waschvorgang wurde noch 2x wiederholt, dann wurden die Oocyten kurz in ein Blockschälchen mit M 16-Medium und schließlich in eine 35 mm-Gewebekulturschale überführt, die 3 Tropfen M 16-Medium, überschichtet mit leichtem Mineralöl (Fisher Scientific), enthielt. Die Oocyten wurden in einem dieser Tropfen bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> im Brutschrank bis zur Mikroinjektion gelagert.

#### **2.17.4 Vorbereitung der DNA für die Mikroinjektion**

Das zur Mikroinjektion vorgesehene DNA-Fragment (Skizze 1) wurde durch einen Restriktionsverdau aus dem Vektor isoliert (siehe 2.8.1; Nordeen, 1988; Oetjen et al., 1994; Schwaninger et al., 1995b), aus einem Agarose-Gel isoliert (siehe 2.11.2) und mit Mikroinjektionspuffer auf eine Konzentration von 1-2 ng/µl (Brinster et al., 1985) eingestellt; nach Filtration über einen Millipore-Filter (Typ HY, 0,45 µm) wurde die DNA bei -20°C gelagert. Direkt vor der Injektion wurde die DNA 15 Minuten bei 12000 UpM zentrifugiert.



Skizze 1: **Struktur des Luciferase-Reportergens 4xSCRET81Luc (Schwaninger et al., 1995b).** Das verwendete Reportergen steht unter der Kontrolle von vier Kopien eines Oligonukleotids mit der CRE-Sequenz des Somatostatingens der Ratte. Das CRE-Oktamer ist unterstrichen. In Klammern ist die Lage des Oligonukleotids relativ zum Transkriptionsstartpunkt im Somatostatingen angegeben. Die Kleinbuchstaben kennzeichnen den GATC-Überhang. TK: Thymidin-Kinase; SCRE: Somatostatin cAMP responsives Element; CRE: cAMP responsives Element.

### 2.17.5 Herstellung von Halte- und Injektionspipetten

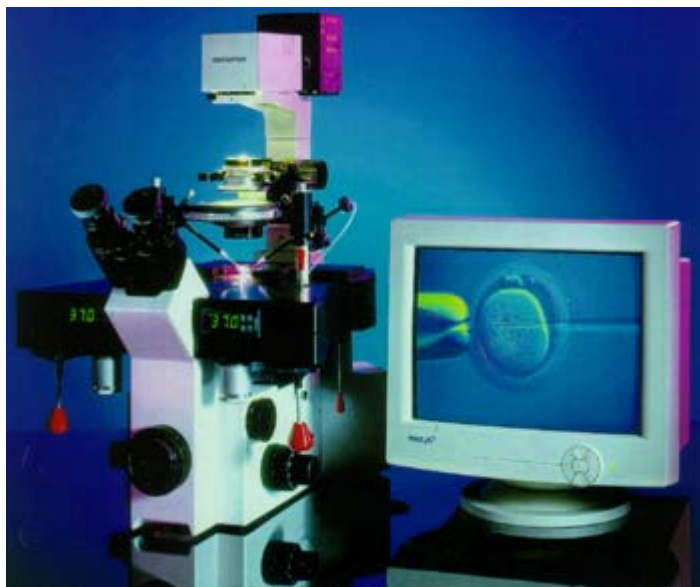
Für die Herstellung der Haltepipetten wurden Kapillaren aus Borosilikatglas verwendet. Ca. 10 cm lange Abschnitte wurden in der Mitte bei kleiner Flamme über dem Alkoholbrenner erhitzt; bei einsetzender Glasschmelze wurde die Kapillare aus der Flamme genommen, per Hand ausgezogen und gebrochen. Sofern die Kapillaren an der Spitze eine gerade Bruchkante und einen Durchmesser von 80-120 µm aufwiesen, wurden sie auf einer Mikroschmiede (De Fonbrune, Bachofer, Reutlingen) weiterbearbeitet. Unter mikroskopischer Kontrolle wurde die Kapillarspitze über dem glühenden Platin-Iridiumdraht rund und auf eine Öffnungsweite von 10-20 µm zugeschmolzen. Die fertigen Haltepipetten wurden staubfrei aufbewahrt. Die Injektionspipetten wurden aus Borosilikatglas-Kapillaren mit einem Innenfilament (Clark, UK) hergestellt. Die 10 cm langen Kapillaren wurden direkt vor der Mikroinjektion auf einem horizontalen Pipettenpuller (Bachofer, Reutlingen) derart ausgezogen, daß der Durchmesser der Spitze kleiner als 1 µm war.

### 2.17.6 Durchführung der Mikroinjektion



Bei der Mikroinjektion mußte unter einem Invers-Mikroskop (siehe 2.6), ausgestattet mit einem LD (long distance)-Kondensor, gearbeitet werden. Zusätzlich war das Mikroskop zur besseren Kontrastierung der Oocyten-Pronuclei mit einer Differential-Interferenz-Kontrast-Optik nach Nomarski ausgerüstet; die Vergrößerung des Okulars betrug 10x, die der Objektive 10x, 20x und 40x. Zur Mikromanipulation wurde für die Injektionspipette ein motorgesteuerter Manipulator von Eppendorf (Hamburg) eingesetzt, der direkt am Mikroskoptisch befestigt wurde; die Steuerung erfolgte über ein Bedienungspult mit Joystick. Die gefüllte Injektionspipette war über einen luftgefüllten Schlauch mit einem Mikroinjektor (Eppendorf, Hamburg) verbunden, der mittels eines angeschlossenen Kompressors konstante Halte-, Injektions- und Spüldrücke aufbauen konnte. Die Haltepipette wurde, nachdem sie mit einer Transferpipette von hinten mit M 2-Medium gefüllt worden war, an ein mit leichtem Mineralöl gefülltes Schlauchsystem angeschlossen, das am anderen Ende zur Regulation des Unter-/Überdrucks mit einer Mikrometer-Spritze verbunden war. Die Manipulation der Haltepipette erfolgte nach Einspannen in den Manipulator (Bachofer, Reutlingen) für die Grobeinstellung manuell und für die Feineinstellung motorisch. Die Apparatur ist unten dargestellt. Für einen Mikroinjektionsdurchgang wurde eine Injektionspipette von hinten mit der DNA-Lösung (siehe 2.17.4) gefüllt, die sich über Kapillarkraft an dem Innenfilament in die Spitze bewegte; die Füllung war an der Ausbildung eines Meniskus zu erkennen. Danach wurde ein Hohlschliff-Objektträger mit leichtem Mineralöl gefüllt; mit einer Transferpipette wurde vorsichtig ein Tropfen M 2-Medium (ca. 20 µl) unter das Öl plaziert, in den dann 15-20 Oocyten aus dem Gewebekulturschälchen (siehe 2.17.3) übertragen wurden. Danach wurde der Objektträger auf dem Kreutztisch des Mikroskops fixiert, und die Oocyten wurden bei kleinster Vergrößerung fokussiert. Die Haltepipette wurde manuell und motorisch auf Oocyten-Ebene eingestellt, und über die Erzeugung eines leichten Unterdrucks wurde eine Oocyte fixiert. Nun wurde die Injektionspipette in die Arbeitsebene bewegt; der eingestellte Haltedruck lag in der Regel bei 150-400 hPa. Diese Druckstärke bewirkte normalerweise schon ein leichtes Ausströmen der DNA-Lösung, so daß die Applikation eines speziellen Injektionsdrucks nicht notwendig war. Nach Wechseln auf die nächsthöhere Vergrößerung wurde die Durchlässigkeit der Kapillare kontrolliert, indem man die Injektionspipette auf eine nichtfixierte Oocyte richtete und kurz einen Spüldruck von 1500 hPa aufbaute; die Oocyte sollte sich dann bewegen. Jetzt wurden die Oocyten bei 400facher Vergrößerung unter

Verwendung der Nomarski-Optik nacheinander injiziert, durch Benutzung des Kreuztisches konnte eine Sortierung in injizierte/nichtinjizierte Oocyten leicht vorgenommen werden. Beim eigentlichen Injektionsvorgang wurde die Oocyte an der Haltepipette so orientiert, daß einer der Pronuclei peripher der Injektionspipette zugewandt war. Nach genauer Fokussierung dieses Pronucleus wurde die Spitze der Injektionspipette auf die gleiche Ebene eingestellt. Jetzt wurde vorsichtig die Zona pellucida und die Oocytenmembran durchbohrt und dann in den Pronucleus hineingestochen; ein Anschwellen des Pronucleus war ein Indiz für eine erfolgreiche Injektion. Wurde allerdings beim Entfernen der Injektionspipette Kernmaterial mitherausgezogen oder strömte Oocytenplasma in den perivitellinen Spalt, lysierte die Oocyte bald darauf und war für einen Retransfer nicht verwendbar. Nach der Injektion wurden die Oocyten in M 16-Medium gewaschen und bis zum Retransfer wieder bei 37°C/ 5% CO<sub>2</sub> in einem Tropfen M 16-Medium unter Öl aufbewahrt. Bei einer Mikroinjektionssitzung wurden im Durchschnitt 60-100 Oocyten injiziert, von denen ungefähr 50% die Injektion unbeschädigt überstanden.



Mikroinjektionsanlage

Aus: Internet [www.singer.ch/ivfatl2.htm](http://www.singer.ch/ivfatl2.htm)

### **2.17.6.1 Kontrollversuch mit dem Konstrukt 6WTKlacZ**

Kultivierung, Fixierung und Färbung der Blastozysten: Aufgrund der besseren Kultivierungsraten wurde das Konstrukt 6WTKlacZ bei diesem Experiment, das der Überprüfung der Injektionsmethode diente, in Pronuclei von CB6F1-Oocyten injiziert. Nach der Injektion wurden die Oocyten für 3-4 Tage in Tropfen von M16-Medium unter Öl bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> bis zum Erreichen des Blastocysten-Stadiums inkubiert. Dann wurden die Blastocysten zweimal in PBS (1x) gewaschen und für 10 Minuten bei 4°C in 0,25% Glutaraldehyd fixiert. Es folgte ein Färbeschritt von 12-36 Stunden in Färbelösung bei 37°C. Die Mikroinjektion war erfolgreich, Ergebniss ist hier nicht gezeigt (Schöler et al., 1989).

### **2.17.7 Retransfer mikroinjizierter Oocyten**

Für den Retransfer wurden 2-3 Monate alte NMRI-Weibchen eingesetzt, die zeitlich parallel mit den Oocyten-Spendertieren mit den vasektomierten CB6F1-Männchen verpaart worden waren. Bei erfolgreicher Verpaarung (Kontrolle über den Vaginalpfropf) wurde so in den Weibchen der Zustand der Scheinschwangerschaft induziert. Da eine hormonelle Stimulation die Implantation der retransferierten Oocyten ungünstig beeinflussen würde, wurde darauf verzichtet und stattdessen die Zahl der pro Versuch eingesetzten Weibchen auf 15 erhöht, um mit statistischer Wahrscheinlichkeit 2-3 erfolgreiche Verpaarungen zu bekommen. Vor dem eigentlichen Retransfer mußten jeweils 10-20 Oocyten in einer Retransferpipette aufgenommen werden; diese wurde durch Ausziehen einer Pasteurpipette per Hand über einem Alkoholbrenner hergestellt. Sie mußte eine glatte Bruchkante und einen Durchmesser von ca. 150 µm haben. Zunächst wurde die Retransferpipette mit leichtem Mineralöl gefüllt, dann wurden in dieser Reihenfolge eine Luftblase, etwas M 2-Medium, eine weitere Luftblase und schließlich die Oocyten (perlschnurartig; in M 2-Medium) aufgenommen. So präpariert, wurde die Retransferpipette bis zur Benutzung erschütterungsfrei auf Plastilin gelagert. Die Operation wurde mit der Betäubung der Maus (siehe 2.17.1) eingeleitet. Dann wurde nach Desinfektion des entsprechenden Fellbereichs mit 70%igem Äthanol auf dem Rücken in Höhe des letzten Rippenbogens 1 cm seitlich versetzt zur Wirbelsäule die Oberhaut mit einem Querschnitt (ca. 1 cm) geöffnet. War das Ovar (orange) bzw. das anhängende Fettpolster (weiß) sichtbar, wurden ebenfalls die Unterhäute geöffnet und das Ovar mit einer Pinzette an dem Fettpolster herausgezogen und auf dem

Rücken mit einer Gefäßklemme derart fixiert, daß das Ovidukt gut erkennbar war. Unter dem Stereomikroskop wurde die Lage der Oviduktöffnung, des sog. Infundibulums, und der Ampulle bestimmt. Dann wurde die Bursa, eine Membran, die Ovar und Ovidukt umschließt, mit einem Tropfen Adrenalin zur Durchblutungsverminderung beträufelt. Nach vorsichtigem Einreißen der Bursa mittels zweier Feinpinzetten wurde das Infundibulum mit einer Feinpinzette gehalten, während die Spitze der Retransferpipette langsam in das Infundibulum eingeführt wurde. Jetzt wurden die in der Retransferpipette geladenen Oocyten vorsichtig ausgeblasen, bis in der Ampulle eine Luftblase als Indiz eines erfolgreichen Retransfers sichtbar war. Nach Entfernen der Gefäßklemme wurden Ovar, Ovidukt und Uterus mit einer stumpfen Pinzette wieder in die richtige Körperlage gebracht, danach wurden die einzelnen Häute mit einer Pinzette zusammengehalten und mit einer Wundklammer verschlossen. Bei Bedarf wurde ein zweiseitiger Retransfer durchgeführt. Nach Abschluß des Eingriffs wurde die Wunde mit Wundpuder versorgt und die Maus bis zum Nachlassen der Narkose auf die Wärmeplatte (37°C) gelegt. Eine erfolgreiche Implantation der Oocyten wurde durch Wiegen der Foster-Mutter an den Tagen 10 und 15 nach dem Retransfer überprüft.

#### **2.17.8 Markierung und Analyse der erzeugten Tiere**

Nach erfolgreich verlaufener Schwangerschaft wurden die Nachkommen (F<sub>0</sub>-Generation) im Alter von 17-21 Tagen von der Mutter entwöhnt und nach Geschlecht getrennt. Bei dieser Gelegenheit wurde den Tieren zwecks Gewinnung von DNA (siehe 2.7.1) eine Schwanzbiopsie (ca. 1 cm) entnommen und gleichzeitig zur Unterscheidung der einzelnen Tiere, diese durch kleinen Schnitt am Ohr des jeweiligen Tiers markiert. Die Transgenität wurde durch Southern-Blot (siehe 2.11.3) mit anschließender DNA-Hybridisierung (siehe 2.12) bzw. durch PCR (siehe 2.14.1) getestet.

#### **2.18 Computerunterstützte Analyse von Sequenzdaten**

Zur Ermittlung von Restriktionsschnittstellen, Auffinden definierter Sequenzen und ähnlichen Anwendungen wurde das Anwendungsprogramm "DNA Star" der Firma DNA Star Inc. (Madison, Wisconsin, USA) benutzt.

### **2.19 Messung der Luciferase-Aktivität im Gehirn und Peripherie**

4xCRE-Luc-transgene Mäuse wurden durch cervicale Dislokation getötet. Sofort danach wurden die entsprechenden Organe dem Tier entnommen und entweder: Homogenisiert (siehe 2.27) und die Luciferase Aktivität gemessen (siehe 2.28) oder Native Schnitte aus dem Gehirn angefertigt (siehe 2.22; 2.23; 2.24 und 2.25), homogenisiert (siehe 2.27) und die Luciferase Aktivität gemessen (siehe 2.28) oder Kryoschnitte aus dem Gehirn angefertigt und mit Luciferase-Assay-Substrat A und B bedeckt und die Lumineszenz-Signale anschließend mit einer gekühlten „slow scan“ CCD-Kamera gemessen (siehe 2.20).

### **2.20 Nachteule (Night Owl LB 981), Systembeschreibung**

#### **2.20.1 Aufbau und Funktion einer CCD-Kamera**

Der Name CCD steht für „charge-coupled device“. Es handelt sich um einen lichtempfindlichen Sensor der in der Lage ist, Licht über einen längeren Zeitraum zu sammeln und zu speichern. Sobald Photonen auf die Sensor Oberfläche treffen, werden im CCD-Chip Elektronen abgegeben und in den Zellen des CCD-Chips gespeichert. Ein CCD-Chip besteht aus Tausenden von einzelnen Zellen (Pixel). Je mehr Photonen auf ein Pixel auftreffen, desto mehr Elektronen werden frei. Ein CCD-Chip besteht aus Halbleitermaterial welches entsprechend gefertigt wurde um auf den Einfall von Licht zu reagieren. Aufgrund der enorm hohen Empfindlichkeit des CCD-Chips, können die Belichtungszeiten erheblich kurz ausfallen. Das fertige CCD Bild kann direkt per Computer verändert und weiter verarbeitet werden und damit komfortable Auswertung der CCD-Aufnahme.

#### **2.20.2 Einsatz und Arbeitsweise**

Night Owl LB 981 ist ein Imaging-System für Lumineszenzmessungen, mit dem Aufnahmen im Makro- wie im Mikrobereich über einen großen Intensitätsbereich gemacht und ausgewertet werden können.

Night Owl LB 981 besteht aus folgenden Komponenten:

Das Aufnahmegerät enthält die Bewegungsmechanik mit Kamera und Objektiv sowie die Elektronik. Durch die hochauflösende CCD-Kamera, die hermetisch vakuumgekapselt ist und mit einem Peltierelement auf  $-73\text{ }^{\circ}\text{C}$  gekühlt wird (Standard-Auflösung: 230 mm x 150 mm) und das spezielle 25 mm hochgeöffnete Objektiv 0,95 wird eine hohe Empfindlichkeit und Bildqualität gesichert. Die Steuerung des Aufnahmesystems und die Bildverarbeitung und Auswertung erfolgt über das *Softwaresystem Win Light*. Es ist eine Windows-Applikation, die praktisch das ganze Spektrum der Bildverarbeitungsfunktionen enthält. Das zugehörige Rechnersystem besteht aus einem Pentium-Rechner mit Kamera-Interfac einem hochauflösenden Bildschirm. Die Bildausgabe kann auf jedem Windows-Drucker (Laser- oder Tintenstrahldrucker) oder wahlweise auf einem Videoprinter erfolgen.

### **2.21 Herstellung von coronaren und sagittalen Kryoschnitten**

Die transgenen Mäuse 4xCRE-Luc wurden durch cervicale Dislokation getötet. Anschließend wurde das Gehirn präpariert und in eine 8cm-Zellkulturschale mit eiskaltem 1x PBS gegeben. Das Gehirn wurde, um das Gewebe beim Einfrieren vor Eiskristallen zu schützen, in Isopentan (5ml/20ml-Becherglas) getaucht. Das Becherglas wurde langsam in flüssigen Stickstoff getaucht, bis das Präparat gefroren war. Anschließend wurden mit einem auf  $-26^{\circ}\text{C}$  vorgekühlten Mikrotom 40 $\mu\text{m}$  dicke coronare und sagittale Schnitte angefertigt. Diese Schnitte wurden dann auf Objektträger gebracht, mit Luciferase-Assay-Substrat A und B (jeweils 50 $\mu\text{l}$ ) bedeckt und die Lumineszenz-Signale anschließend mit einer gekühlten „slow scan“ CCD-Kamera gemessen (siehe 2.20).

### **2.22 Herstellung von coronaren nativen Schnitten**

Die transgenen Mäuse 4xCRE-Luc wurden durch cervicale Dislokation getötet. Sofort danach wurde das Gehirn präpariert und in eiskaltes 1x PBS gegeben. Anschließend wurde das Gehirn in 4%igen,  $37^{\circ}\text{C}$  warmen Agar im 2x2cm-PVC-Rahmen gegeben. Dieses Block wurde dann auf Eis gekühlt. Das Agarblock wurde auf eine Vibratomplatte, die in einer mit eiskaltem 1x PBS gefüllten Kammer lag, mit Sekundenkleber (Roti-Coll<sup>®</sup> 1, Roth Karlsruhe) so befestigt, daß die caudale Seite unten und die rostrale Seite oben war, und somit

aufeinanderfolgend 500 µm dicke coronare Schnitte (LEICA VT1000 S, Leica Microsystems Nussloch GmbH) angefertigt werden konnten. Dann wurden diese Schnitte auf Objektträger gebracht und mit Luciferase-Assay-Substrat A und B (jeweils 50µl) bedeckt und mit der Night Owl (siehe 2.20) gemessen.

### **2.23 Herstellung von seriellen coronaren nativen Schnitten**

Die transgenen Mäuse 4xCRE-Luc wurden durch cervicale Dislokation getötet, sofort danach wurde das Gehirn präpariert und coronare Gehirnschnitte angefertigt (siehe 2.22). Diese Schnitte wurden dann in ein Eppendorfgefäß gegeben und in flüssigen Stickstoff schockgefroren. Danach wurden die einzelnen Schnitte homogenisiert (siehe 2.27) und die Luciferase-Aktivität gemessen (siehe 2.28).

### **2.24 Vergleich der Luciferase-Aktivität in der rechten und der linken Hemisphäre im Gehirn 4xCRE-Luc-transgener Mäuse**

Die transgenen Mäuse 4xCRE-Luc wurden durch cervicale Dislokation getötet, sofort danach wurde das Gehirn präpariert und coronare Gehirnschnitte angefertigt (siehe 2.22). Diese coronaren Schnitte wurden auf einen Objektträger gebracht und mit einem Skalpell in zwei symmetrische Hälften geteilt. Die einzelnen Hälften wurden dann in ein Eppendorfgefäß gegeben und sofort in flüssigen Stickstoff schockgefroren. Danach wurden die einzelnen Hälften homogenisiert (siehe 2.27) und die Luciferase Aktivität gemessen (siehe 2.28).

### **2.25 Inkubation von nativen coronaren Gehirnschnitten 4xCRE-Luc-transgener Mäuse**

Die transgenen Mäuse 4xCRE-Luc wurden durch cervicale Dislokation getötet, sofort danach wurde das Gehirn präpariert und coronare Gehirnschnitte angefertigt (siehe oben). Diese coronaren Schnitte wurden auf einen Objektträger gebracht und mit einem Skalpell in zwei symmetrische Hälften geteilt. Jede Hälfte wurde dann in eine 3,5cm-Zellkulturschale gegeben, die 2ml DMEM enthielt und die Inkubation bei Raumtemperatur (RT) erfolgte. Nach der jeweiligen Inkubation wurden die Schnitte homogenisiert (siehe 2.27) und die Luciferase Aktivität gemessen (siehe 2.28).

**2.26 Gewebeentnahme und Präparation nach dem jeweiligen in vivo Versuch**

Die transgenen Mäuse 4xCRE-Luc wurden je nach Versuchsgruppe mit dem entsprechenden Antidepressivum (siehe 2.30) i. p. injiziert. Die transgenen Mäuse 4xCRE-Luc wurden am Versuchsende durch cervicale Dislokation getötet. Anschließend wurde das Gehirn präpariert und in eine 8cm-Zellkulturschale mit eiskaltem 1x PBS gegeben. Das Gehirn lag in der 8cm-Zellkulturschale auf der ventralen Seite. Mit dem Skalpell wurde das Gehirn in 9 definierte Areale geteilt.

**Bulbus olfactorius:** Um den Bulbus zu präparieren, erfolgte eine Schnittführung parallel zum Vorderhirn.

**Kleinhirn/Pons:** Das Skalpell wurde zwischen Colliculi und Kleinhirn angesetzt, das Gehirn durchtrennt, und Pons und Kleinhirn voneinander getrennt.

**Colliculi:** Um die Colliculi zu präparieren, erfolgte eine Schnittführung parallel zum übrigen Hirnteil.

**Vorderhirn:** Das übrige Hirnteil wurde umgedreht, so daß es jetzt auf der dorsalen Seite lag. Das Skalpell wurde vor dem Chiasma Opticum angesetzt und das Gehirn durchgetrennt.

**Hypothalamus:** Mit dem Skalpell wurde der Hypothalamus präpariert.

**Cortex:** Beide Hemisphären wurden mit dem Skalpell präpariert.

**Hippocampus:** Der freigelegte Hippocampus wurde heraus präpariert.

**Resthirn:** Die restlichen Teile wurden mit der Pinzette gesammelt und als Resthirn definiert.

Die einzelnen Teile wurden sofort in flüssigen Stickstoff gegeben und bis zur weiteren Bearbeitung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.



**Injektionslösungen**

Imipramin-HCl            10mg/kg

Desipramin-HCl        10 mg/kg

Fluoxetin-HCl          10 mg/kg

Alle Substanzen wurden in autoklavierten  
bidestillierten Wasser gelöst.

**2.27 Homogenisieren der einzelnen Gewebeproben und Messung der Luciferase-  
Reportergen-Aktivität**

Die Gewebeproben wurden in 250 µl (200 mg Naßgewicht/1ml) Kaliumphosphat-Aufschlußpuffer pH 7,8 (siehe unten), im 10 cm langen und 1 cm Durchmesser Homogenisator (Schütt, Göttingen) aufgenommen und mit Ultra Turax T25 basic/IKA Labortechnik homogenisiert. Das Homogenat wurde in ein Eppendorfgefäß überführt. Zum Aufschluß der Zellen wurde das Homogenat in flüssigen Stickstoff schockgefroren, bei 37 °C im Wasserbad kurz aufgetaut und unter starkem Schütteln (VF2, IKA- Labortechnik, Staufen i. Br.) gründlich geschüttelt. Dieser Vorgang wurde 3 mal wiederholt. Anschließend wurde das Homogenat für 7 min bei 4 °C und 14000 UpM (Eppendorf 5417 R) zentrifugiert und der Überstand zum Nachweis der Luciferase-Aktivität (siehe 2.28) und zur Proteinmessung (siehe 2.15) eingesetzt.

**Kaliumphosphat-Aufschlußpuffer**

DTT	1	mM
EGTA	4	mM
EDTA	4	mM
PMSF	0,7	mM
Leupeptin	5	µg/ml
Pepstatin	5	µg/ml
Aprotinin	5	µg/ml

**2.28 Messung der Luciferase im Homogenat**

Das Enzym Luciferase ist in der Lage, unter ATP-Verbrauch und in Anwesenheit von  $Mg^{2+}$ -Ionen mit Luciferin einen Luciferase-Luciferyl-AMP-Komplex zu bilden. Dieser Komplex wird in einem weiteren Reaktionsschritt oxidativ decarboxyliert, und es entsteht unter Emission von Licht freie Luciferase, Oxyluciferin, AMP sowie  $CO_2$  (De Wet et al., 1987). Steht das Luciferase-Substrat (Luciferin) im Überschuß zur Verfügung, so ist die Lichtemission proportional zur Luciferasekonzentration und kann im Luminometer quantifiziert werden. Die so im Homogenat transgener Mäuse quantifizierte Menge Luciferase erlaubt damit Rückschlüsse auf den Expressionsgrad des Transgenes, welches Luciferase als Reportergen trägt (Skizze 1). Zur Bestimmung der Luciferase-Aktivität im Homogenat wurden 50 µl des Homogenats (siehe 2.27) zu 368 µl gekühltem Luciferase-Assay-Mix in einem Luminometerröhrchen (Sarstedt, Nürnberg) pipettiert und gut gemischt. Zu diesem Reaktionsansatz wurden im Luminometer (Autolumat LB 953 E&G Berthold, Wildbach) automatisch 200 µl gekühlte Luciferin-Lösung injiziert. Die Lichtemission der luciferasekatalysierten Reaktion (s.o.) wurde dann bei einer Wellenlänge von 560 nm über einen Zeitraum von 20 s gemessen und als Luciferase-Einheit dargestellt. Als Referenz- bzw. Nullwert diente die reine Luciferin-Lösung.

**Glycylglycin-Lösung**

Glycylglycin, pH 7,8	25 mM
MgSO <sub>4</sub>	15 mM
EDTA, pH 8,0	4 mM

**Kaliumphosphat-Puffer (KP-Puffer)**

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	100 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	100 mM

Der pH wurde durch Titrieren auf 7,8 eingestellt.

**Luciferin-Lösung**

Luciferin	1 mM
DTT	10 mM
In Glycylglycin-Puffer	

**Luciferase-Assay-Mix**

KP-Puffer	16,5 mM
Glycylglycin-Puffer	82,4 % (v/v)
DTT	1,1 mM
ATP	2,2 mM

**2.29 Tiermodell der Depression: Chronischer psychosozialer Streß**

Auf Empfehlung von Prof. Dr. Robert J. Blanchard (University of Hawaii) wurde das etablierte Tiermodell der Depression verwendet (Kudryavtseva et al., 1991). Es beruht auf einem natürlichen Verhalten der Tiere und produziert im Unterschied zu anderen Verfahren psychosozialen Streß. Es ist somit das tierschonendste, dem Versuchszweck dienende etablierte Modell. Adulte männliche 4xCRE-Luc-transgene Mäuse wurden für 5 Tage einzeln gehalten, um Gruppeneffekte auszuschließen. Jeweils 2 Tiere wurden dann in einen gemeinsamen Polycarbonatkäfig (etwa 45x25x20 cm) gesetzt, welcher durch eine durchsichtige, durchlöchernte Plastikwand in zwei Hälften geteilt wurde, so daß die Tiere sich sehen und riechen konnten, physische Kontakte aber ausgeschlossen waren. Beide Käfighälften hatten eine eigene Futter- und Wasserversorgung. Nach zwei Tagen wurde zwischen 14 und 17 Uhr für 10 Minuten die Trennscheibe entfernt und die Interaktion der beiden Mäuse verfolgt. Die Mäuse wurden danach in ihre ursprünglichen Käfighälften gesetzt und die Plastikwand eingefügt. Dies wurde täglich 25 Tage lang wiederholt. In der anhaltenden sozialen Auseinandersetzung entwickelte eine der beiden Mäuse ein submissives Verhalten, während die andere Maus ein dominant-aggressives Verhalten entwickelte (Kudryavtseva et al., 1991). Parallel dazu wurden die Kontrolltiere einzeln streßfrei gehalten.

Die Klassifizierung der Mäuse erfolgte durch Beobachtung der Versuchstiere. Am Versuchsende wurden die submissiven Mäuse und die Kontrolltiere zum Zweck der Organentnahme und anschließenden Messung von Parametern durch cervicale Dislokation getötet.

### **2.30 Behandlung von 4xCRE-Luc-transgenen Mäusen mit Antidepressiva**

#### **2.30.1 Chronische Behandlung**

Das Antidepressivum 1 (Imipramin-HCl, 10 mg/kg, 2 x täglich, um 9:00 Uhr und um 18:00 Uhr), das Antidepressivum 2 (Desipramin-HCl, 10 mg/kg, 2 x täglich, um 9:00 Uhr und um 18:00 Uhr), das Antidepressivum 3 (Fluoxetin-HCl, 10 mg/kg, 1 x täglich, um 9:00 Uhr ) oder das Lösungsmittel (bdest. H<sub>2</sub>O) wurden i. p. appliziert (200µl). Die Kontrolltiere der jeweiligen Versuchsgruppe wurden mit dem Lösungsmittel injiziert (200µl). Dies wurde 21 Tage lang durchgeführt. Die Mäuse wurden am 22. Tag um 8:00 Uhr durch cervicale Dislokation getötet.

#### **2.30.2 Akute Behandlung**

Das Antidepressivum 1 (Imipramin-HCl, 10 mg/kg, 2 x, um 9:00 Uhr und um 18:00 Uhr) wurde i. p. appliziert (200µl). Die Kontrolltiere wurden mit dem Lösungsmittel injiziert (200µl). Die Mäuse wurden am nächsten Tag um 8:00 Uhr durch cervicale Dislokation getötet.

#### **2.30.3 Chronische Behandlung von dem psychosozialen Streß ausgesetzten Mäusen**

Das Antidepressivum 1 (Imipramin-HCl, 10 mg/kg, 2 x täglich, um 9:00 Uhr und um 18:00 Uhr), das Lösungsmittel (bdest. H<sub>2</sub>O) für die Kontrolltiere wurden i. p. appliziert (200µl). Dies wurde ab dem 5. bis zum 25. Versuchstag (21 Tage lang) durchgeführt. Die Mäuse wurden am 26. Tag um 8:00 Uhr durch cervicale Dislokation getötet.

**2.31 Software, Statistik**

Statistische Analysen wurden mit Hilfe des Sigma Stat-Programmes, Version 1.0 (Jandel Scientific GmbH, Erkrath) durchgeführt. Der gepaarte t-Test wurde hier eingesetzt.

### **3. Ergebnisse**

#### **3.1 Herstellung der transgenen Mäuse 4xCRE-Luc**

Im Rahmen der genaueren Erklärung des molekularen Wirkmechanismus der Antidepressiva sollte in transgenen Mäusen geprüft werden, ob Antidepressiva die CRE-vermittelte Transkription in vivo verändern. Für diesen Zweck wurden 4xCRE-Luc-transgene Mäuse hergestellt (siehe 2.17), die das Luciferase-Reportergen exprimieren. Das verwendete Konstrukt enthält neben dem codierenden Abschnitts des Reporterenzym Luciferase den minimalen Thymidin-Kinase-Promotor (von – 81 bis + 52) des Herpes-Simplex-Virus und 4 Kopien des Somatostatin-CREs der Ratte (Skizze 1). Die Sequenz des Somatostatin-CREs der Ratte ist eine gut charakterisierte Bindungsstelle des ubiquitären Transkriptionsfaktors CREB (Oetjen et al. 1994). Abb. 1 zeigt einen Southern Blot mit den entsprechenden Banden (siehe 2.11.3) einiger Nachkommen (F<sub>0</sub>- und F<sub>1</sub>-Generation). Im linken Bild der Abb. 1 ist den Blot der SomCRE-Luc 38.1-Linie zu sehen, wobei Som für Somatostatin, CRE für cAMP responsives Element, 38.1 für Retransfer-Nummer steht. Zwei weitere transgene Linien sind etabliert worden (Blots sind nicht gezeigt).

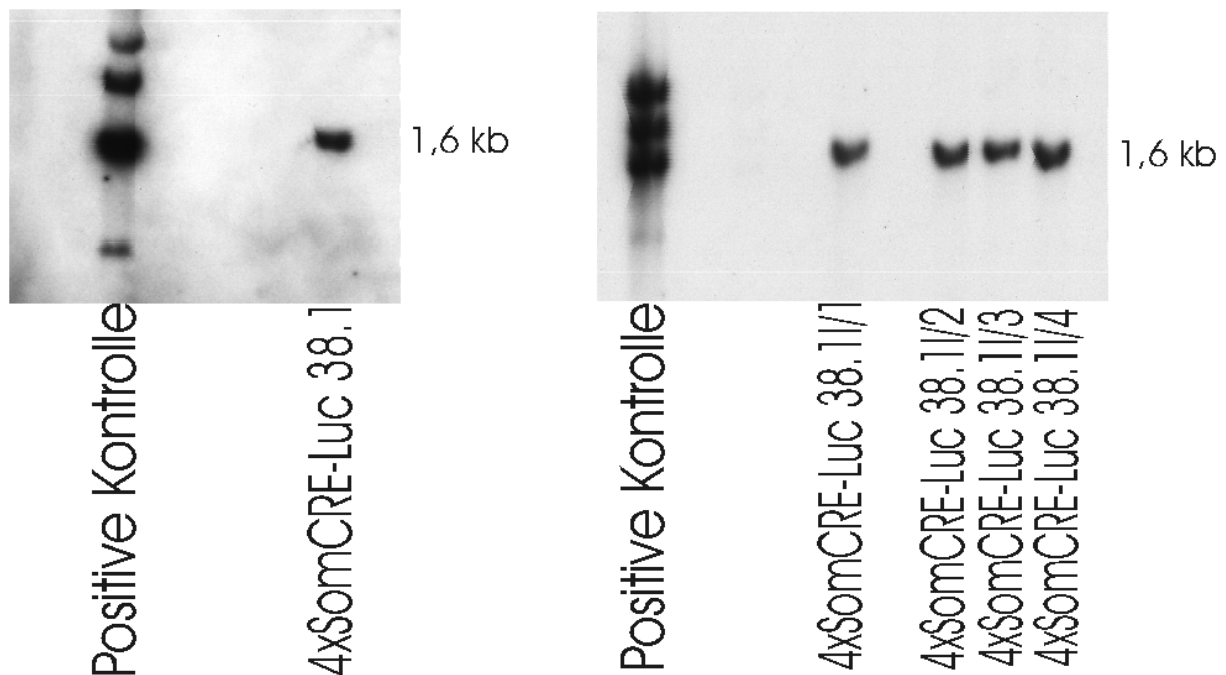


Abb.1: **Nachweis der Transgenität der 4xSomCRE-Luc Mäuse mittels Southern Blot.** Genomische DNA wurde mit Bgl II geschnitten, in einem 0,8%igen Agarose Gel getrennt, auf Nitrocellulose-Filter geblottet und mit einer radioaktiv markierten Sonde hybridisiert. Am rechten Rand sind die Größen der hybridisierenden Genfragmente eingezeichnet (Größen in kb). SomCRE 38.1 I/1, 2, 3 und 4 sind die Nummer der Tiere aus Linie 38.1; Linkes Bild: Founder (F<sub>0</sub>), rechtes Bild: F<sub>1</sub>; SomCRE-Luc: Somatostatin cAMP responsives Element Luciferase.

Die Technik der „Polymerase-Kettenreaktion“ (PCR) erlaubt den schnellen Nachweis der Expression des Luciferase-Reportergens. Die isolierte genomische DNA (siehe 2.7.1) wurde in die PCR eingesetzt. Die PCR-Produkte wurden auf einem 1%igen Agarosegel analysiert. Abb. 2 zeigt die enthaltenen Banden der PCR-Produkte.

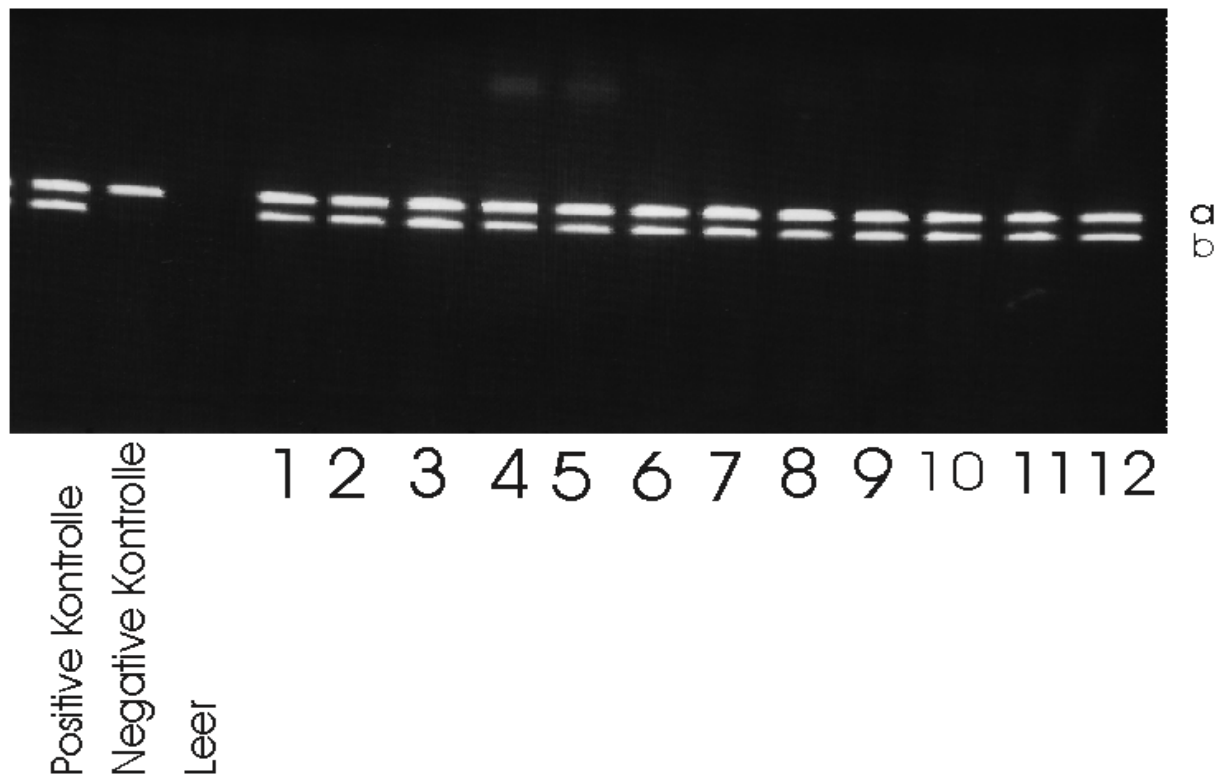


Abb.2: Die Expression des 4xSomCRE-Luc-Transgens lässt sich mittels PCR unter Verwendung von spezifischen Luc-Primern in 4xSomCRE-Luc-transgenen Mäusen nachweisen. Ca. 250-300 ng genomische DNA aus der Linie 38.1 wurden in PCR-Reaktionen unter Verwendung des Luc-up/Luc-down-Primerpaares eingesetzt. Die Annealingtemperatur betrug 58°C, die Anzahl der Zyklen 30. Die Größe des erwarteten PCR-Produktes betrug 618 bp. Die PCR-Produkte wurden nach der Reaktion elektrophoretisch in einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt und mit EtBr-Färbung sichtbar gemacht. a=  $\beta$ -globin 493 bp; b= Luciferase 618 bp; 1-12: Nummer der transgenen Tiere; SomCRE-Luc: Somatostatin cAMP responsives Element Luciferase.

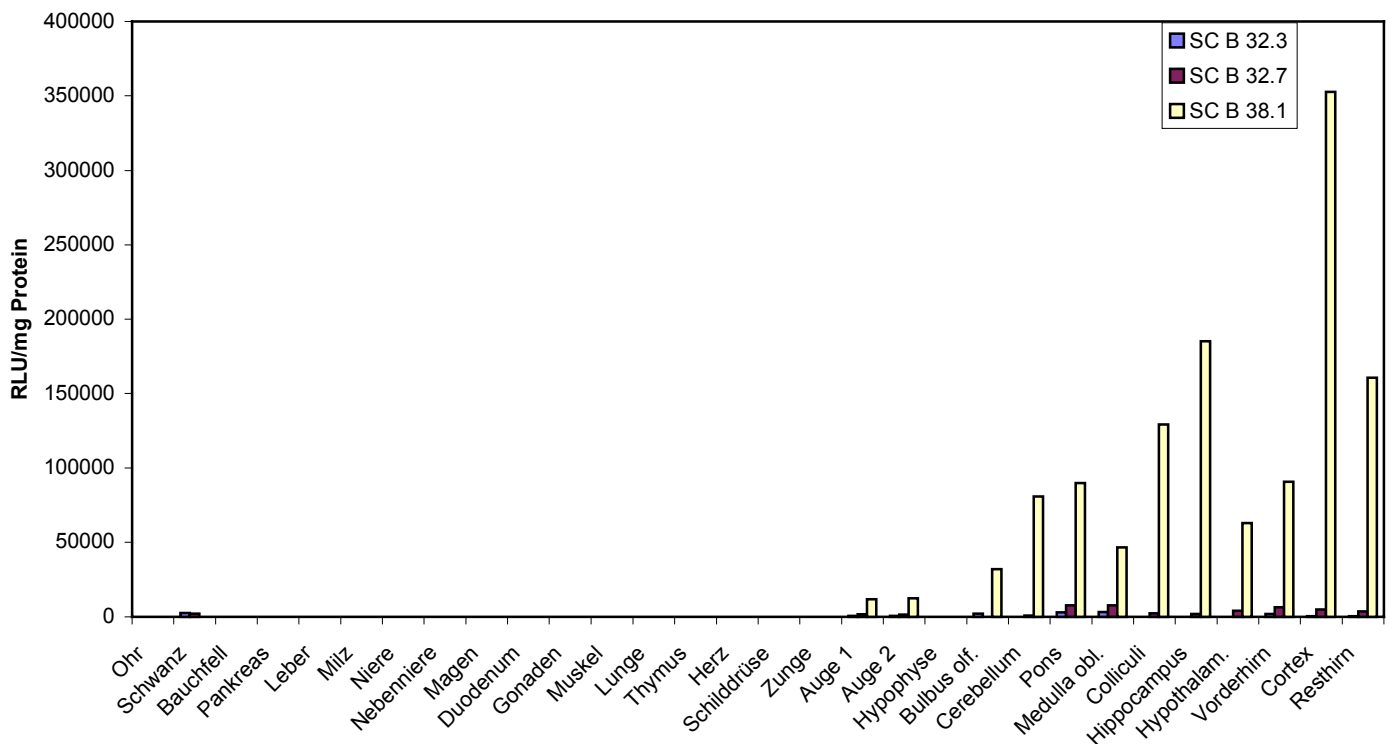
### 3.2 Expression des Luciferase-Reportergens

#### 3.2.1 Untersuchung der Expression des Luciferase-Reportergens im Gehirn und in peripheren Geweben der 4xCRE-Luc-transgenen Mäuse der Linien 32.3, 32.7 und 38.1

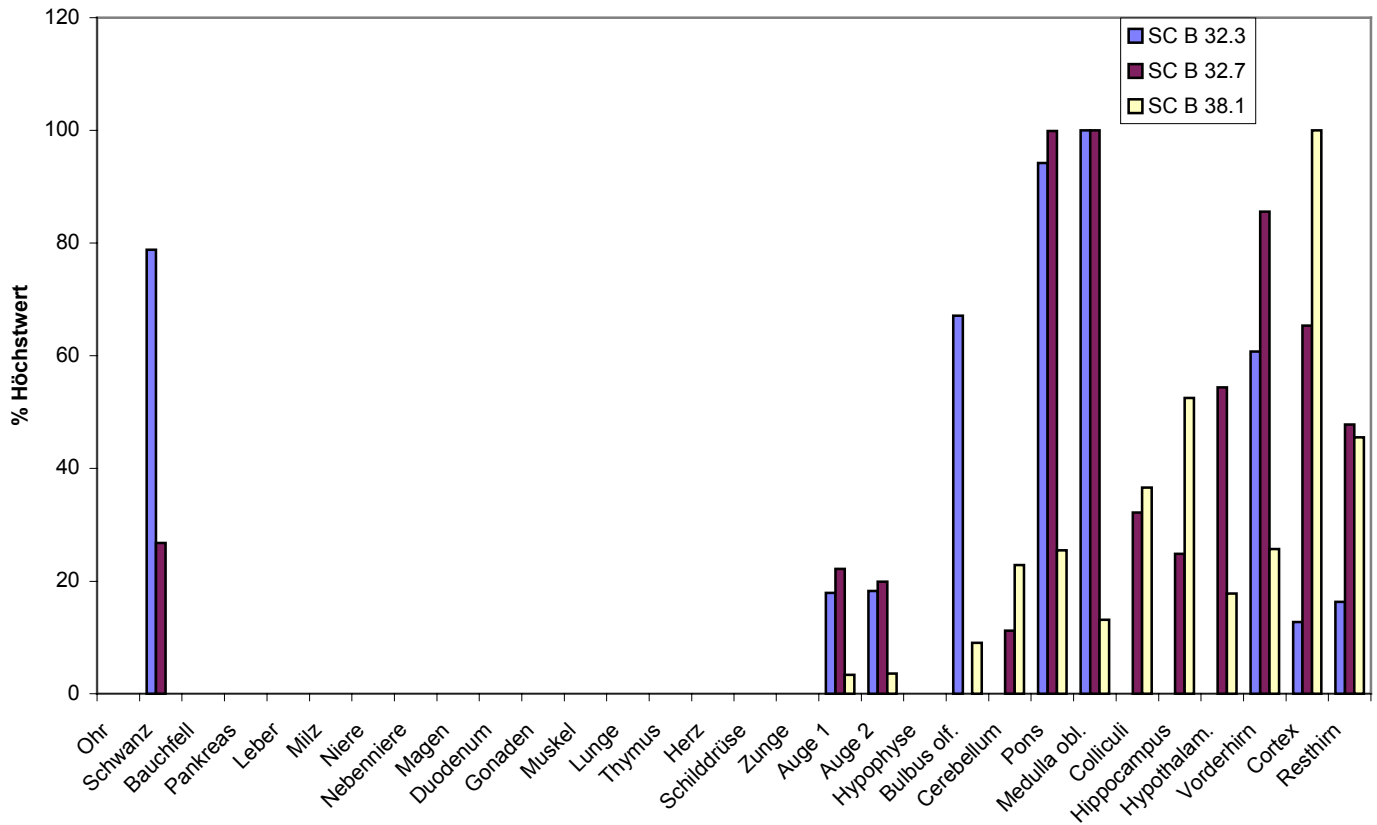
Nach Präparieren der jeweiligen Gewebe, Homogenisieren (siehe 2.27) und Messung der Luciferase-Aktivität im Extrakt dieser Gewebe (siehe 2.28) wurde in den Linien 32.3, 32.7 und 38.1 (Abb. 3) eine Expression des Reportergens im Gehirn gefunden. Während die



absolute Expressionsstärke zwischen den einzelnen Linien variierte (Abb. 3), ergab der relative Vergleich ein übereinstimmendes Expressionsmuster in den 3 Linien mit den höchsten Aktivitäten in definierten Hirnarealen und praktisch keiner Aktivität in der Peripherie (Abb. 4). Eine hohe Reportergen-Expression wurde in Cortex, Hippocampus, Colliculi, Vorderhirn, Pons und Cerebellum gefunden (Abb. 4).



**Abb.3: Expression des 4xCRE-Luc-Reportergens in Geweben adulter Tiere verschiedener unabhängiger Linien.** Verschiedene Gewebe der 4xCRE-Luc-transgenen Mäuse der Linien 32.3, 32.7 und 38.1 wurden präpariert, im Aufschlußpuffer homogenisiert und die Luciferase-Aktivität im Überstand im Luminometer gemessen. Die Expression ist angegeben als relative Lichteinheit pro mg Protein. Bei den Aktivitäten handelt es sich um Mittelwerte aus 6 unabhängigen Versuchen mit Doppelbestimmungen. SCB: 4xCRE-Luc.



**Abb.4: Relative Expression des 4xCRE-Luc-Reportergens in Geweben adulter Tiere verschiedener unabhängiger Linien.** Verschiedene Gewebe der 4xCRE-Luc-transgenen Mäuse der Linien 32.3, 32.7 und 38.1 wurden präpariert, im Aufschlußpuffer homogenisiert und die Luciferase-Aktivität im Überstand im Luminometer gemessen. Für jede unabhängige Linie wurde der relative Lichteinheit-Wert des höchstexprimierenden Gewebes als 100% definiert. Alle anderen Gewebe wurden relativ dazu ausgedrückt. Bei den Aktivitäten handelt es sich um Mittelwerte aus 6 unabhängigen Versuchen mit Doppelbestimmungen. SCB: 4xCRE-Luc.

### **3.2.2 Darstellung der Luciferase-Expression an Schnitten des Gehirns 4xCRE-Luc-transgener Mäuse der Linien 32.7 und 38.1**

Zur Detektion der Luciferase-Aktivität an Hirnschnitten wurden Kryoschnitte (siehe 2.21) mit dem Luciferase-Assay-Substrat (Substrat A/B jeweils 50 µl) bedeckt und anschließend sofort mit der Night Owl (siehe 2.20) gemessen. Die detektierten Lumineszenz-Signale wurden in Falschfarben über dem Lichtbild dargestellt. Die Analyse der Coronar- und Sagittal-Schnitte ergab hohe Luciferase-Aktivität im Cortex, Hippocampus, Fimbria, Corpus callosum, Commissura anterior und Pons (Abb. 5, 6 und 7; rote Farbe bedeutet hohe Intensität; blaue Farbe bedeutet niedrige Intensität).

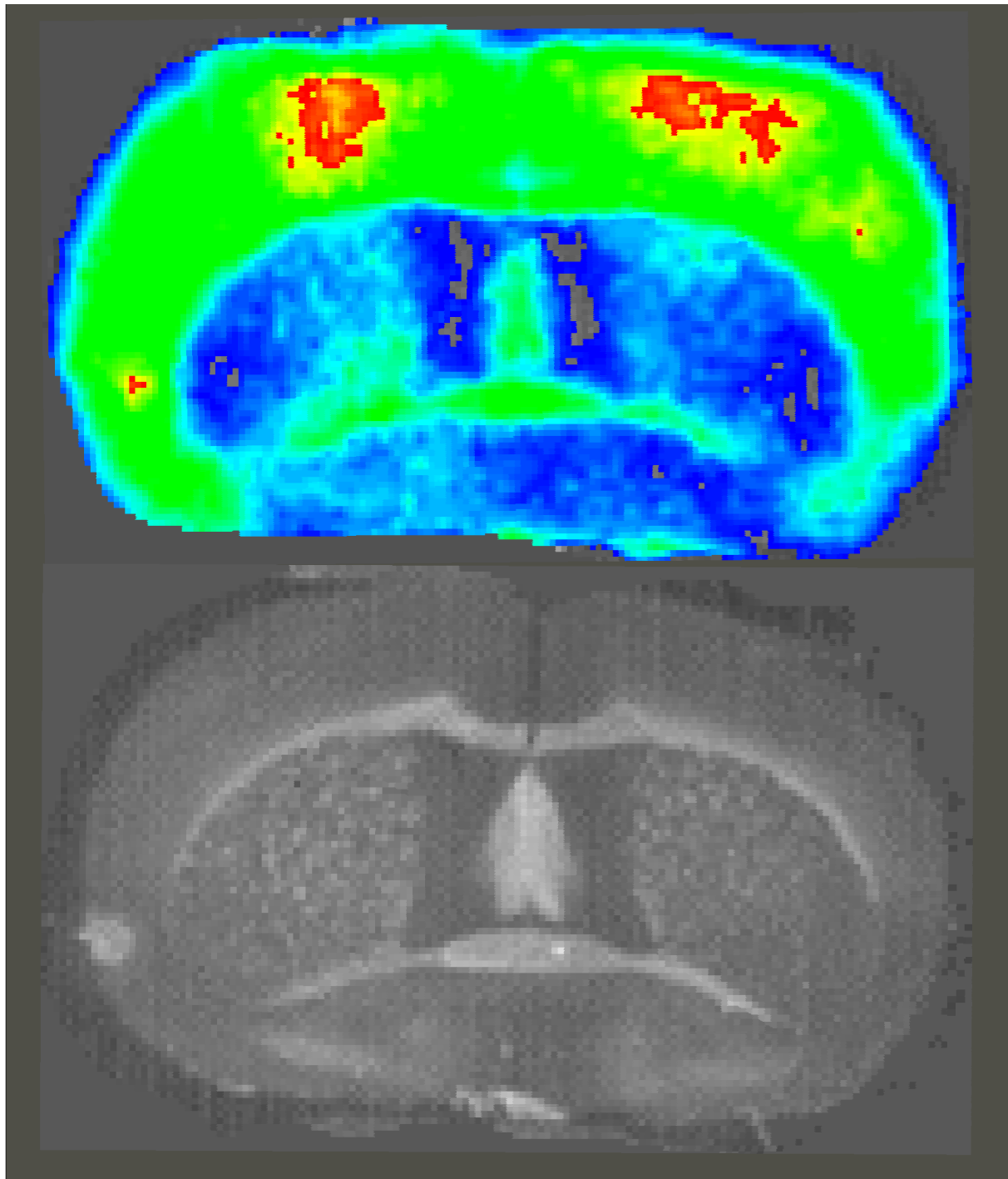


Abb.5: **Expression des Luciferase-Reportergens an einem coronaren Gehirnschnitt (Kryoschnitt).** Zur Detektion der Luciferase-Aktivität in Hirnschnitten wurde 40 µm dicken Coronar-Kryoschnitt einer 4xCRE-Luc-transgenen Maus der Linie 38.1 im Mikrotom angefertigt und diese auf Objektträger gebracht. Dann wurde das Präparat mit Luciferase-Assay-Substrat A und B bedeckt und die Lumineszenz-Signale anschließend mit einer gekühlten „slow scan“ CCD-Kamera gemessen. Im oberen Bildteil sind die Lumineszenz-Signale in Falschfarbe abgebildet, der untere Bildteil zeigt das dazugehörige Lichtbild. Rote Farbe bedeutet hohe, blaue niedrige Intensität. Der vorliegende Schnitt wurde auf der Höhe des Chiasma Opticums angefertigt.

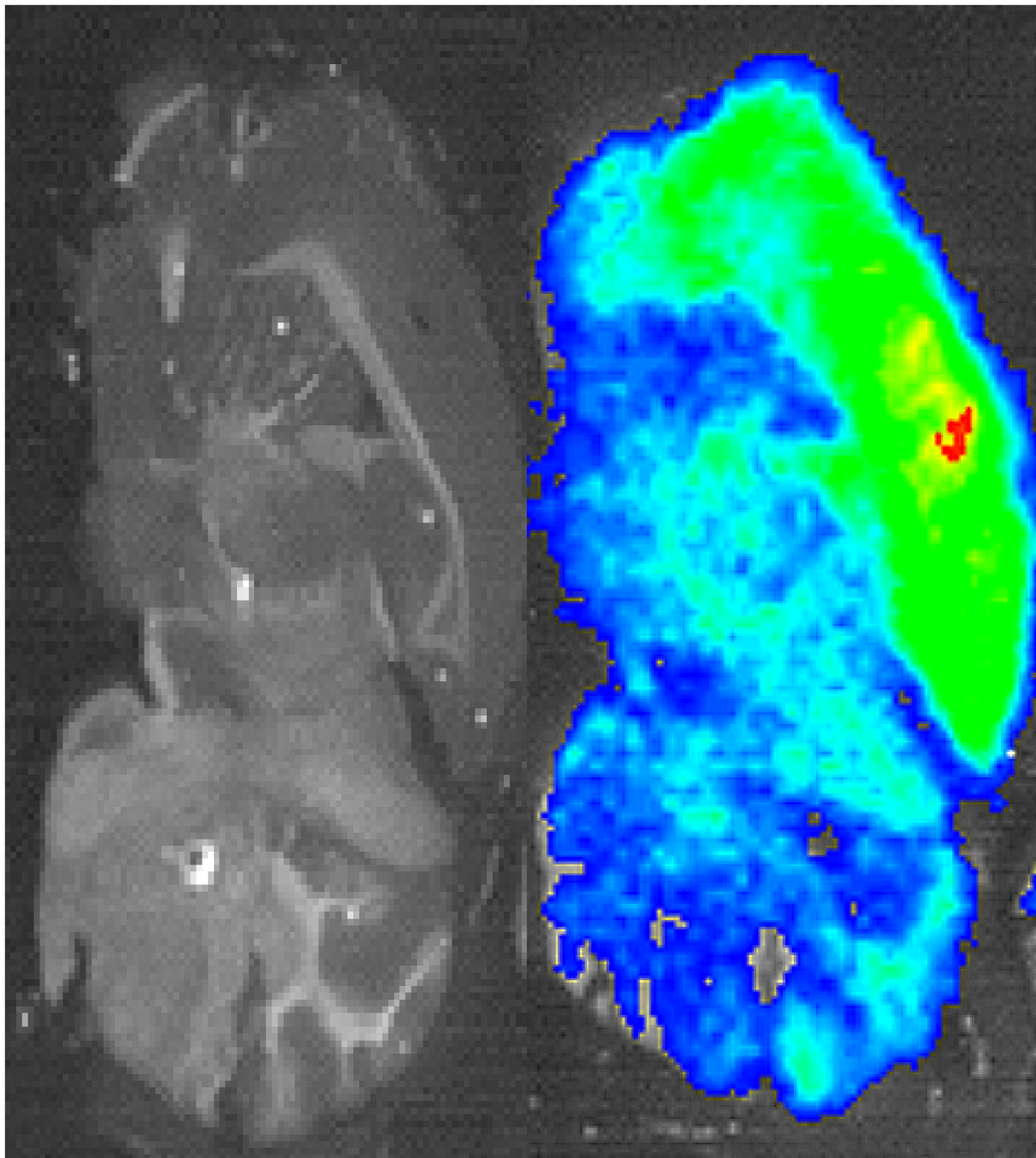
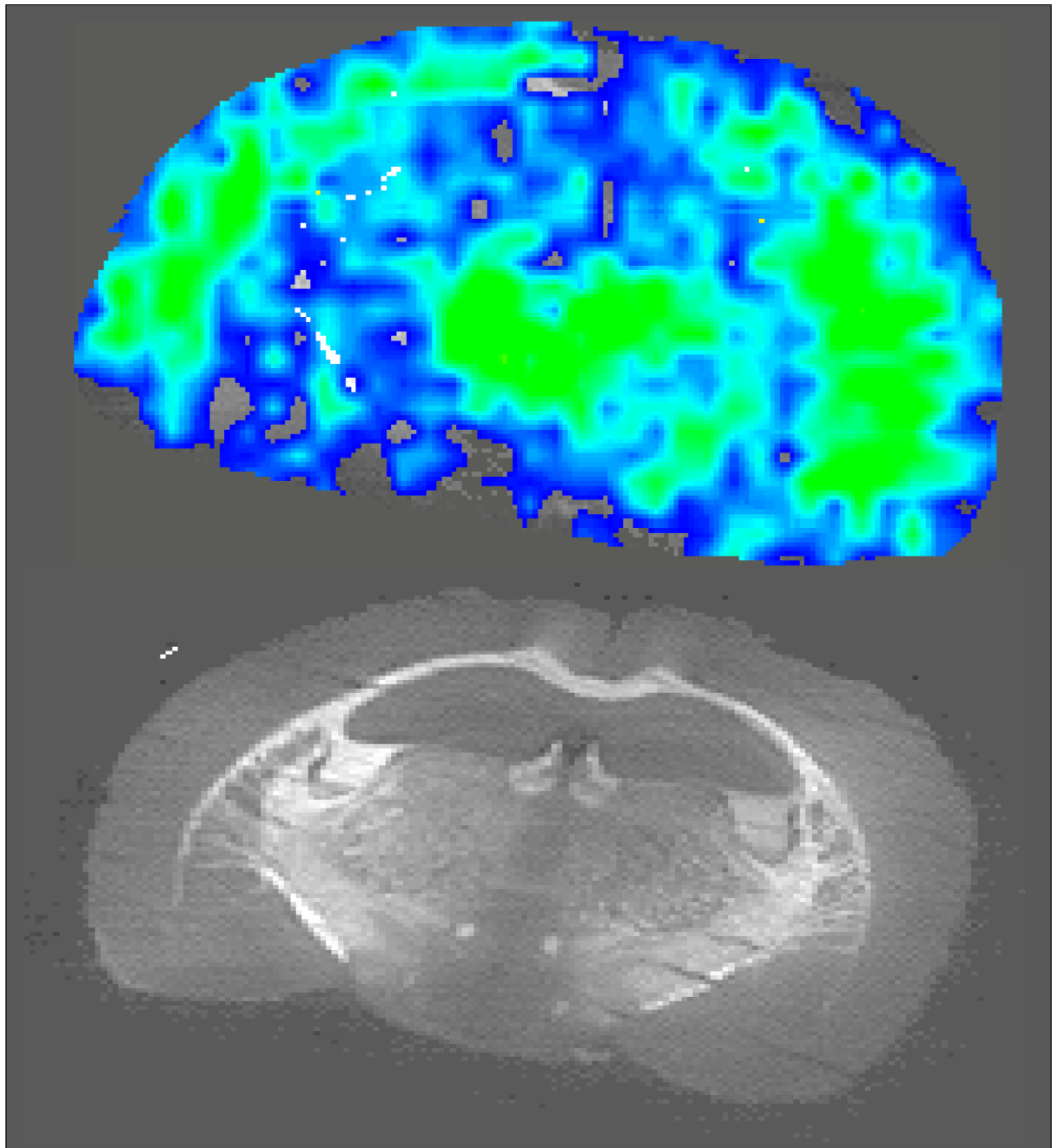
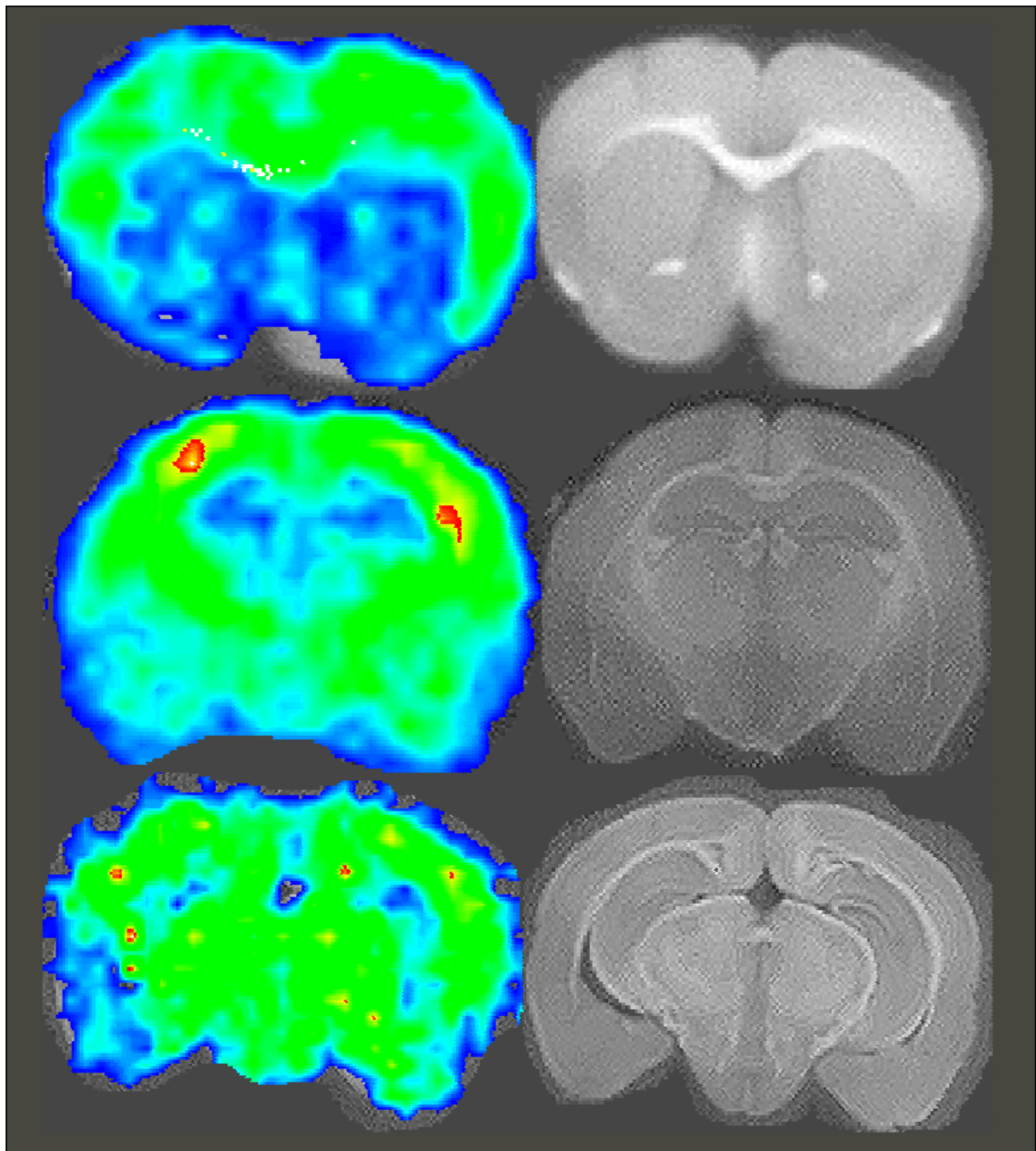


Abb.6: **Expression des Luciferase-Reportergens an einem sagittalen Gehirnschnitt (Kryoschnitt).** Zur Detektion der Luciferase-Aktivität in Hirnschnitten wurde 40  $\mu\text{m}$  dicken Sagittal-Kryoschnitt einer 4xCRE-Luc-transgenen Maus der Linie 38.1 im Mikrotom angefertigt und diese auf Objektträger gebracht. Dann wurde das Präparat mit Luciferase-Assay-Substrat A und B bedeckt und die Luciferase-Aktivität anschließend mit einer gekühlten „slow scan“ CCD-Kamera gemessen. Im rechten Bildteil sind die Lumineszenz-Signale in Falschfarbe abgebildet, der linke Bildteil zeigt das dazugehörige Lichtbild. Rote Farbe bedeutet hohe, blaue niedrige Intensität. Der vorliegende Schnitt wurde auf der Höhe der Mittellinie angefertigt.



**Abb.7: Expression des Luciferase-Reportergens an einem coronaren Gehirnschnitt (Kryoschnitt).** Zur Detektion der Luciferase-Aktivität in Hirnschnitten wurde 40 µm dicken Coronar-Kryoschnitt einer 4xCRE-Luc-transgenen Maus der Linie 32.7 im Mikrotom angefertigt und diese auf Objektträger gebracht. Dann wurde das Präparat mit Luciferase-Assay-Substrat A und B bedeckt und die Luciferase-Aktivität anschließend mit einer gekühlten „slow scan“ CCD-Kamera gemessen. Im oberen Bildteil sind die Lumineszenz-Signale in Falschfarbe abgebildet, der untere Bildteil zeigt das dazugehörige Lichtbild. Rote Farbe bedeutet hohe, blaue niedrige Intensität. Der vorliegende Schnitt wurde im Hippocampus-Bereich angefertigt.

Mit dem Vibratom können 100 µm bis 700 µm dicke native Schnitte bei RT angefertigt werden und sowohl für die Detektion der Luciferase-Aktivität als auch zur Inkubaion dieser Schnitte und Bestimmung des Luciferasegehaltes in diesen Schnitten (siehe 2.25) benutzt werden. Zur Detektion der Luciferase-Aktivität an Hirnschnitten wurden native Coronarschnitte (siehe 2.22) mit dem Luciferase-Assay-Substrat (Substrat A/B jeweils 50 µl) bedeckt und anschließend sofort mit der Night Owl (siehe 2.20) gemessen und detektierte Luciferase-Aktivitäten wurden in Falschfarben dargestellt. Die Analyse der Coronarschnitte ergab hohe Luciferase-Aktivität im Cortex, Corpus callosum, Comissura anterior und Fimbria (Abb. 8).



**Abb.8: Expression des Luciferase-Reportergens an 3 coronaren Gehirnschnitten (native Schnitte).** Die Expression des Luciferase-Reportergens an nativen Coronarschnitten beginnend von der rostralen bis caudalen Region detektiert. Hierzu wurden 500  $\mu\text{m}$  dicke Coronar-Nativschnitte des Gehirns einer 4xCRE-Luc-transgenen Maus der Linie 38.1 mit dem Vibratom angefertigt und diese auf Objektträger gebracht. Dann wurde das Präparat mit Luciferase-Assay-Sbstrat A und B bedeckt und anschließend die Luciferase-Aktivität mit einer gekühlten „slow scan“ CCD-Kamera gemessen. Im linken Bildteil sind die Lumineszenz-Signale in Falschfarbe abgebildet, der rechte Bildteil zeigt das dazugehörige Lichtbild. Rote Farbe bedeutet hohe, blaue niedrige Intensität. Der obere Schnitt wurde im Commissura-Anterior-, der mittlere im Hippocampus- und der untere im caudalen Hippocampus-Bereich angefertigt.



### 3.2.3 Verteilung des Luciferase-Reportergens im Gehirn von rostral nach caudal

Die konsekutiven 500 µm dicken Schnitte von 4xCRE-Luc-transgenen Tieren der Linie 38.1 wurden sofort schockgefroren (siehe 2.23), anschließend homogenisiert (siehe 2.27), und der Luciferasegehalt (siehe 2.28) bestimmt. Abb. 9 zeigt, daß die Luciferase-Expression in Schnitt 1 (am meisten rostral) am höchsten ist, in allen weiteren Schnitten ähnlich ist.

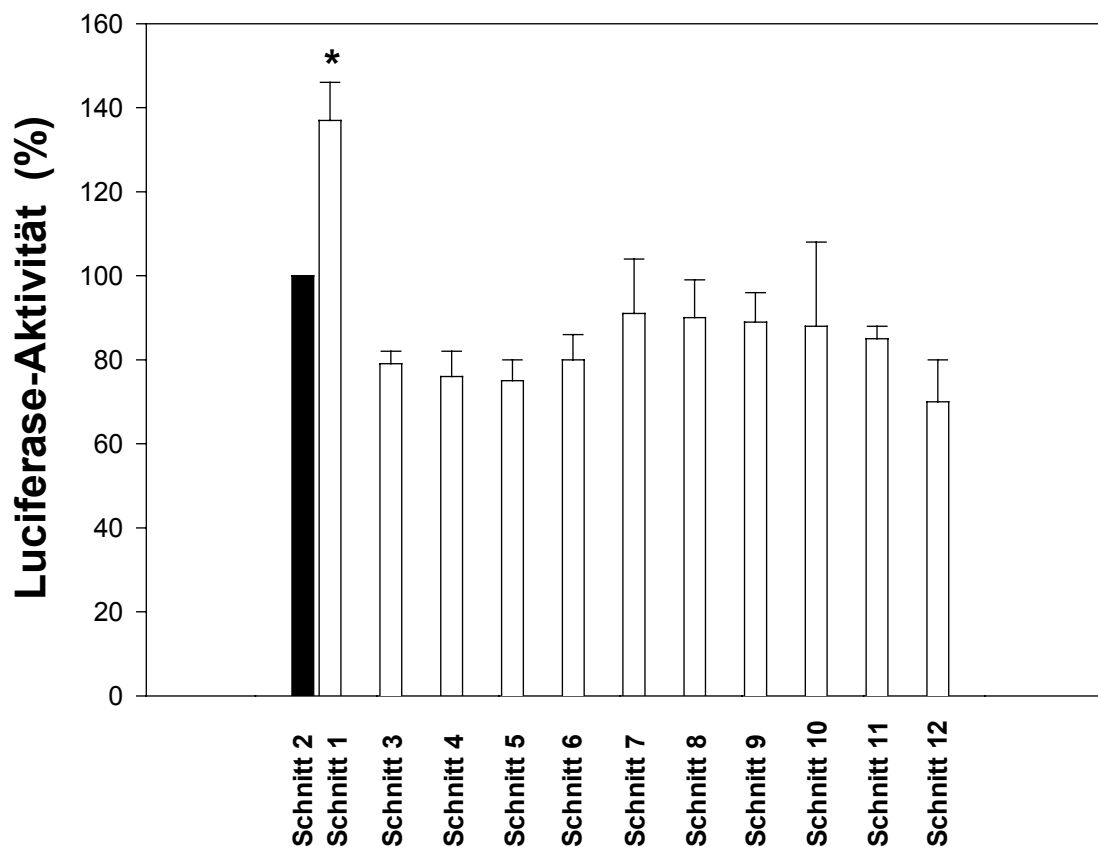


Abb.9: **Rostral-Caudal-Charakterisierung der Reportergen-Expression.** Die Gehirne wurden präpariert und aufeinanderfolgend native Coronarschnitte in rostral-caudaler Orientierung angefertigt. Die Schnitte wurden im Aufschlußpuffer homogenisiert und die Luciferase-Aktivität im Überstand im Luminometer gemessen. Schnitt Nr. 2 (Kontrolle) wurde als 100% definiert, die anderen Schnitte wurden relativ darauf bezogen. Die Aktivitäten sind Mittelwerte und SEMs von sechs Schnitten mit Doppelbestimmungen. \*, signifikante Differenz ( $p < 0,05$ ) im Vergleich zur Kontrollgruppe.

### 3.2.4 Verteilung der Luciferase-Expression in der linken und der rechten Hemisphäre

Es wurde untersucht, ob die Luciferase-Reportergen-Aktivität in der linken und der rechten Hemisphäre unterschiedlich ist. Hier wurden 500 µm dicke Coronarschnitte von 4xCRE-Luc-transgenen Tieren der Linie 38.1 in zwei Hälften geteilt, dann die einzelnen Hälften sofort schockgefroren (siehe 2.24), und diese anschließend homogenisiert (siehe 2.27) und die Luciferase-Reportergen-Aktivität (siehe 2.28) bestimmt. Abb. 10 zeigt, daß es keinen Unterschied in der Luciferase-Reportergen-Aktivität zwischen der linken und der rechten Hemisphäre gibt.

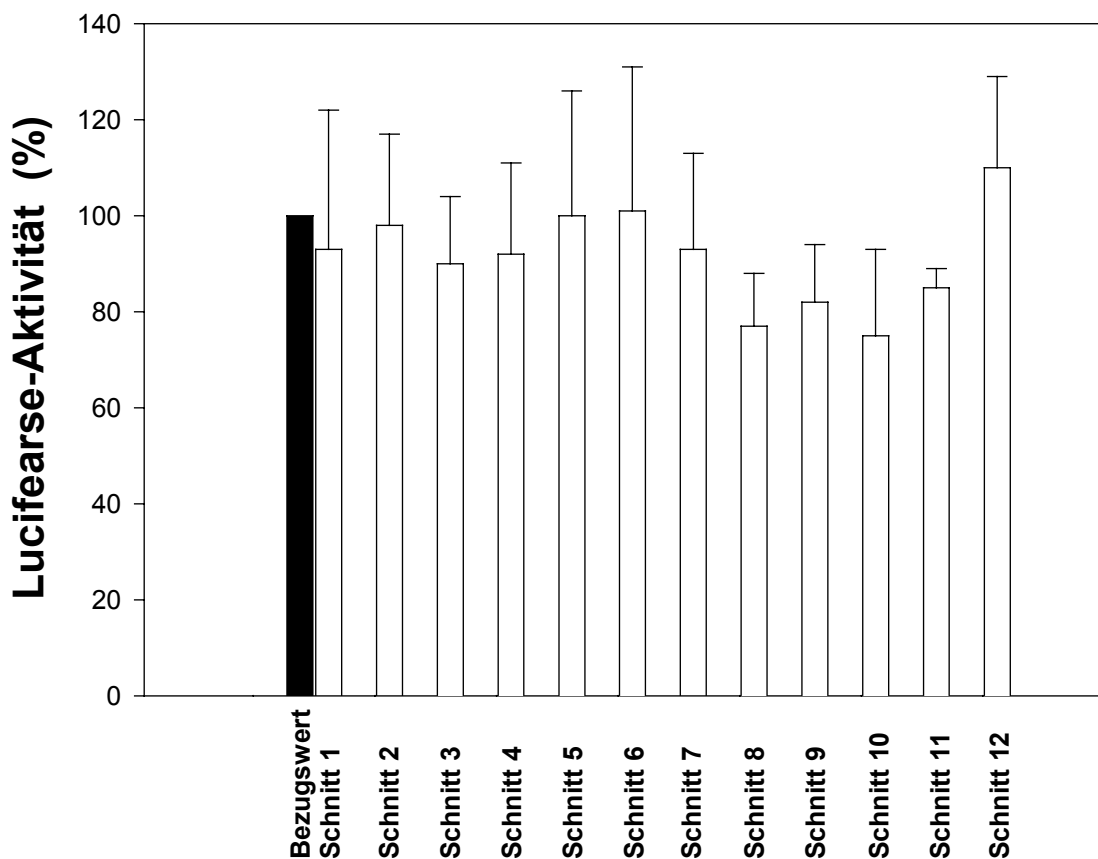


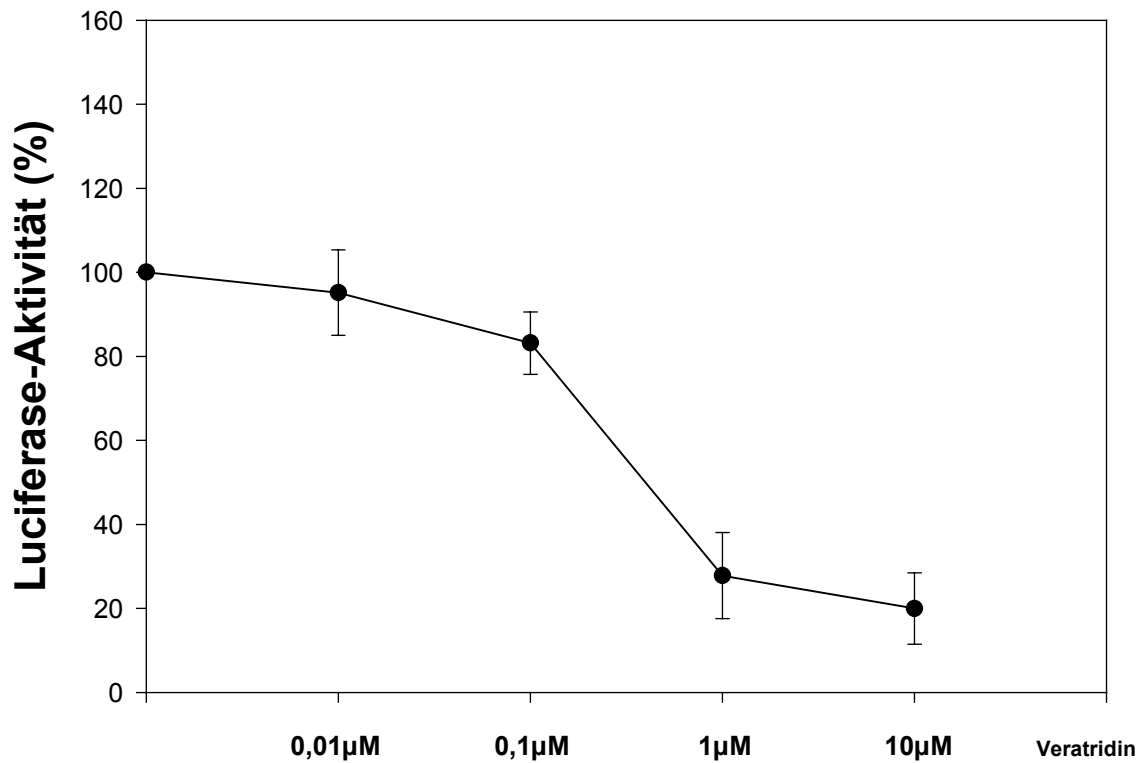
Abb.10: Vergleich der Expression des Reportergens in der rechten und der linken Gehirn-Hemisphäre 4xCRE-Luc-transgener Mäuse der Linie 38.1. Gehirne mehrerer Mäuse wurden präpariert und aufeinanderfolgend native Coronarschnitte beginnend von der

rostralen zur caudalen Region angefertigt. Die Schnitte wurden in zwei symmetrische Hälften geschnitten, in Aufschlußpuffer homogenisiert und die Luciferase-Aktivität im Überstand im Luminometer gemessen. Die linken Hälften wurden jeweils als 100% definiert, die rechten Hälften beziehen sich relativ darauf. Die Reporter-gen-Aktivitäten sind Mittelwerte und SEMs von sechs Schnitten mit Doppelbestimmungen.

### **3.3 Wirkung von Veratridin auf die Luciferase-Expression in Gehirnschnitten in vitro**

#### **3.3.1 Konzentrationswirkungskurve von Veratridin**

Veratridin (VTD) aktiviert an erregbaren Zellen spannungsabhängige  $\text{Na}^+$ -Kanäle mit der Folge von  $\text{Na}^+$ -Einstrom, Depolarisation und  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom (Caterall, 1980; Blaustein, 1975; Adam-Vizi und Ligeti, 1991). Coronare native 500  $\mu\text{m}$  dicke Gehirnschnitte (siehe 2.25) 4xCRE-Luc-transgener Mäuse wurden in DMEM für 12 h bei RT mit den verschiedenen Veratridin-Konzentrationen inkubiert. Die Kontrollschnitte wurden ohne Veratridin inkubiert. Steigende Konzentrationen von Veratridin bewirkten eine Abnahme der Luciferase-Reporter-gen-Aktivität (Abb. 11). Die Veratridin  $\text{IC}_{50}$  lag bei 0,3  $\mu\text{M}$ .



**Abb.11: Konzentrationsabhängigkeit der Wirkung von Veratridin auf die Expression des Reportergens in Coronarschnitten des Gehirns von 4CRE-Luc-transgenen Mäusen der Linie 38.1.** Gehirne wurden präpariert und native Coronarschnitte angefertigt. Die Schnitte wurden in zwei symmetrische Hälften geschnitten. Die Hälften wurden in Gegenwart oder Abwesenheit von Veratridin bei RT für 12 h in DMEM inkubiert, in Aufschlußpuffer homogenisiert und die Luciferase-Aktivität im Überstand im Luminometer gemessen. Die unbehandelten Hälften wurden jeweils gleich 100% definiert, die anderen Hälften beziehen sich relativ darauf. Die Aktivitäten sind Mittelwerte und SEMs aus drei unabhängigen Versuchen mit Doppelbestimmungen.

### 3.3.2 Zeitabhängigkeit der Veratridinwirkung

Es wurden native Coronarschnitte (siehe 2.25) von Gehirnen 4xCRE-Luc-transgener Tiere angefertigt und in DMEM für verschiedene Zeiten inkubiert. Veratridin zeigte nach 12 h Inkubation die höchste Wirkung (Abb. 12).

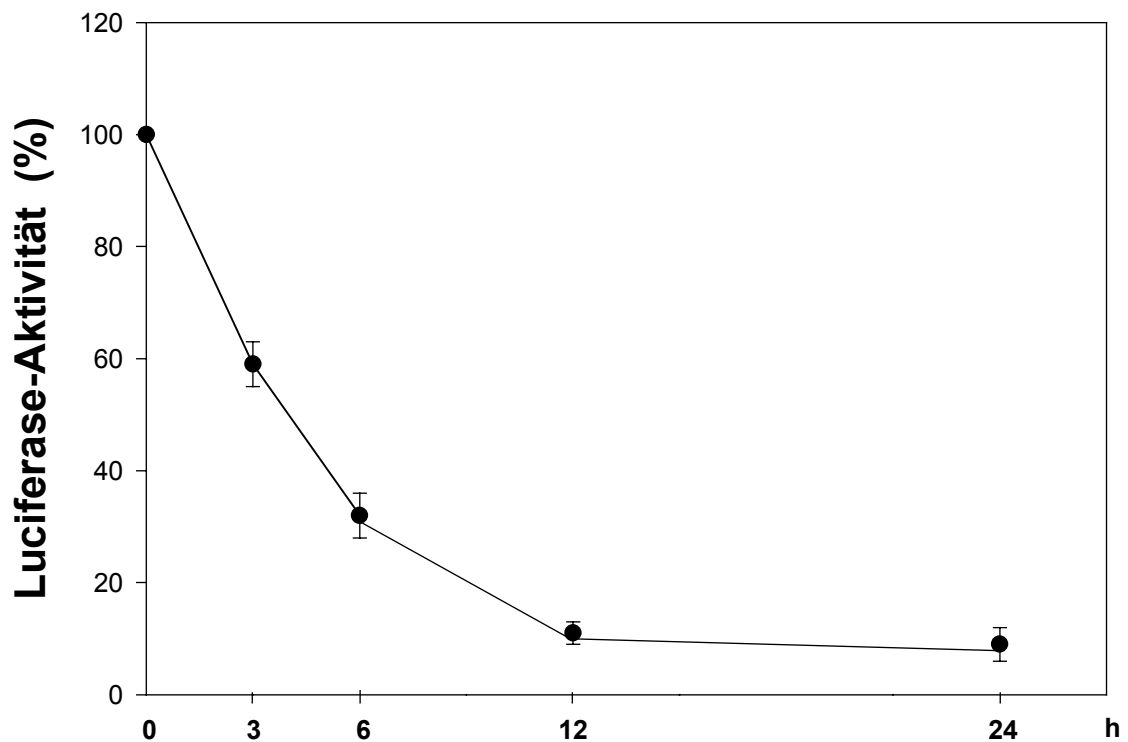


Abb.12: Zeitabhängigkeit der Wirkung von Veratridin (10 µM) auf die Expression des Reportergens in Coronarschnitten des Gehirns von 4xCRE-Luc-transgenen Mäusen der Linie 38.1. Gehirne wurden präpariert und native Coronarschnitte angefertigt. Die Schnitte wurden in zwei symmetrische Hälften geschnitten. Diese wurden in Gegenwart oder Abwesenheit von Veratridin bei RT für 3, 6, 12 und 24 h in DMEM inkubiert, in Aufschlußpuffer homogenisiert und die Luciferase-Aktivität im Überstand im Luminometer gemessen. Die unbehandelten Hälften wurden jeweils gleich 100% definiert, die anderen Hälften beziehen sich relativ darauf. Die Aktivitäten sind Mittelwerte und SEMs aus drei unabhängigen Versuchen mit Doppelbestimmungen.

### 3.3.3 Wirkung von Tetrodotoxin auf die Hemmung der Luciferase-Expression durch Veratridin

Coronare Gehirnschnitte (siehe 2.25) wurden eine halbe Stunde vor der Zugabe der jeweiligen Menge Veratridin mit Tetrodotoxin (TTX) inkubiert. TTX ist ein spannungsabhängiger  $\text{Na}^+$ -Kanal-Blocker (Meder et al., 1997). Abb.13 zeigt, daß TTX die Wirkung von Veratridin ganz aufhob.

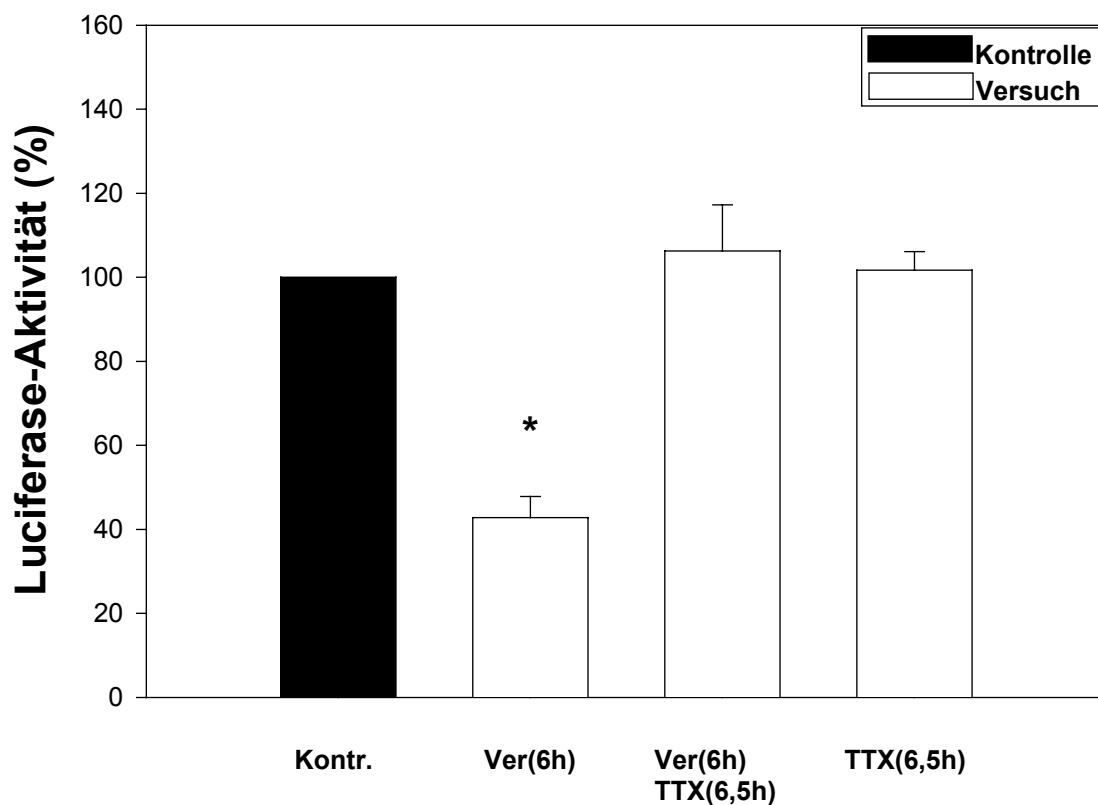


Abb.13: Wirkung von Veratridin (0,5  $\mu\text{M}$ ) und Tetrodotoxin (10  $\mu\text{M}$ ) auf die Expression des Reportergens in Coronarschnitten des Gehirns von 4xCRE-Luc-transgenen Mäusen der Linie 38.1. Gehirne wurden präpariert und native Coronarschnitte angefertigt. Die Schnitte wurden in zwei symmetrische Hälften geschnitten und in Gegenwart oder Abwesenheit von Veratridin, Tetrodotoxin bzw. Veratridin/Tetrodotoxin bei RT für 6 h in DMEM inkubiert. Dann wurden die Präparate im Aufschlußpuffer homogenisiert und die Luciferase-Aktivität im Überstand im Luminometer gemessen. Die unbehandelten Hälften wurden jeweils gleich 100% definiert, die anderen Hälften beziehen sich relativ darauf. Die

Aktivitäten sind Mittelwerte und SEMs aus acht unabhängigen Versuchen mit Doppelbestimmungen; \*, signifikante Differenz ( $p < 0,05$ ) im Vergleich zur Kontrollgruppe. Kontr.: Kontrolle; Ver: Veratridin; TTX: Tetrodotoxin.

### **3.4 Wirkung von Antidepressiva auf die Expression des 4xCRE-Luc-Reportergens in vivo**

#### **3.4.1 Wirkung einer akuten Behandlung mit dem Antidepressivum Imipramin auf die Expression des Reportergens in 4xCRE-Luc-transgenen Mäusen in vivo**

Die 4xCRE-transgenen Mäuse wurden für einen Tag mit Imipramin-HCl (10mg/kg, i. p., 2 x täglich; siehe 2.30.2) behandelt. Die akute Imipramin-HCl- Behandlung hatte keine Wirkung auf die Expression des Reportergens (Abb. 14).

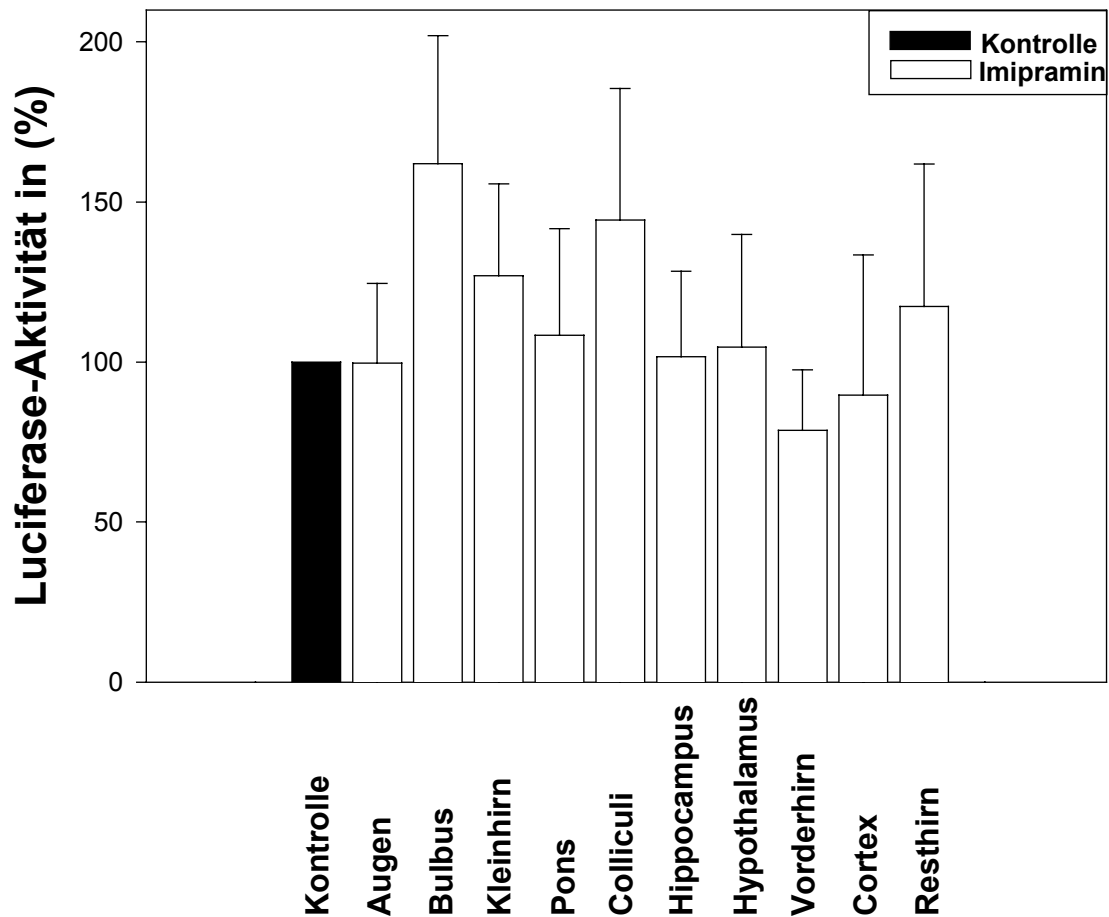
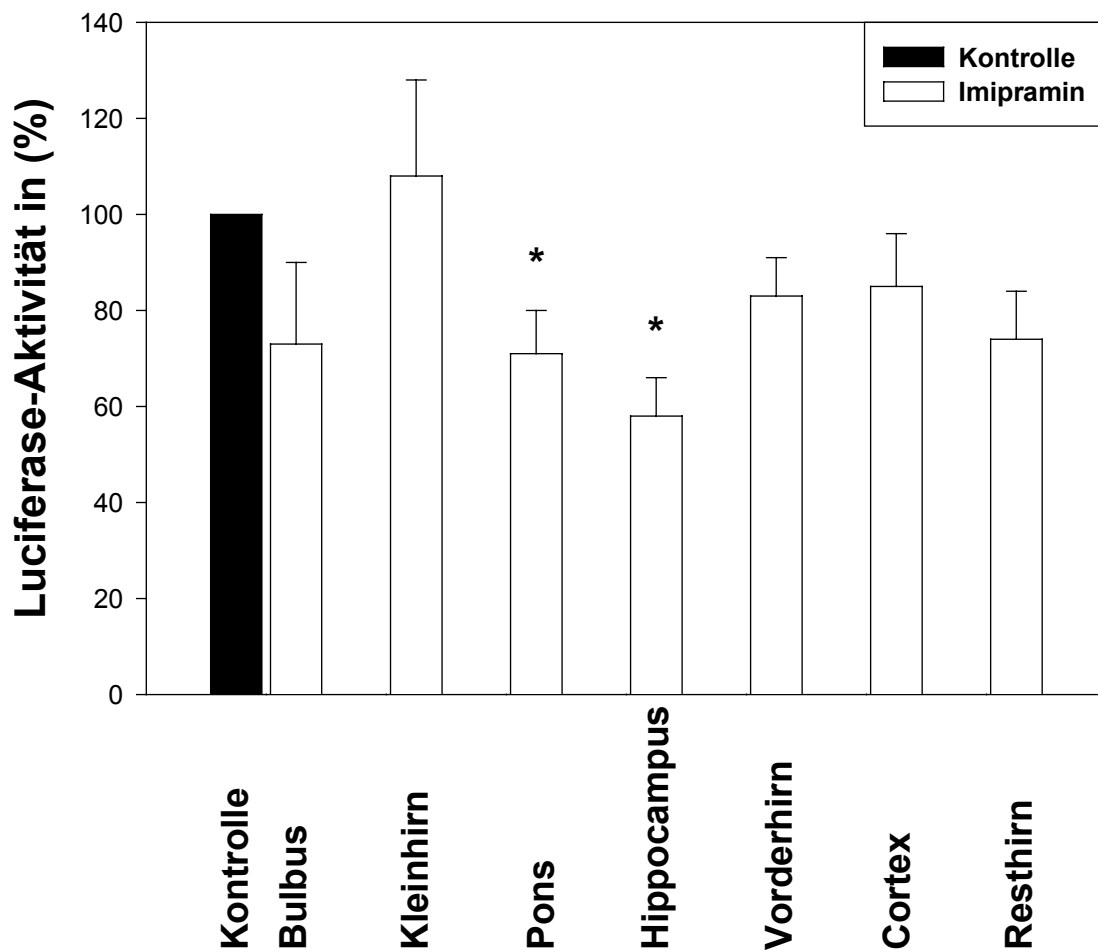


Abb.14: **Wirkung einer akuten Gabe von Imipramin auf die Expression des Reportergens in definierten Gehirnarealen 4xCRE-Luc-transgener Mäuse der Linie 38.1.** Die Mäuse wurden für 1 Tag mit Imipramin-HCl (10 mg/kg; i. p., 2 x täglich) oder mit Lösungsmittel (Kontrollen) behandelt. Danach wurden die definierten Gehirnteile präpariert, in Aufschlusspuffer homogenisiert und die Luciferase-Aktivität gemessen. Die angegebenen Luciferase-Aktivitäten beziehen sich jeweils auf die zugehörige Kontrolle, deren absoluter Wert als 100% definiert wurde. Die Aktivitäten sind Mittelwerte und SEMs aus drei Tieren mit Doppelbestimmungen.



### **3.4.2 Wirkung einer Dauerbehandlung mit dem Antidepressivum Imipramin auf die Expression des Reportergens in 4xCRE-Luc-transgenen Mäusen in vivo**

Es wurde die Wirkung einer 21-tägigen Behandlung mit Imipramin auf die Expression des Reportergens in 4xCRE-Luc-transgenen Mäusen in vivo untersucht. Hier wurden die 4xCRE-Luc-transgenen Mäuse chronisch (3 Wochen) (siehe 2.30.1) mit Imipramin-HCl (10mg/kg, i. p., 2 x täglich) oder mit Lösungsmittel (Kontrollen) behandelt. Abb. 15 zeigt eine Abnahme der Luciferase-Aktivität um 29% in Pons und um 42% im Hippocampus.



**Abb.15: Wirkung einer chronischen Behandlung mit Imipramin auf die Expression des Reportergens in Gehirnarealen 4xCRE-Luc-transgener Mäuse der Linien 32.7 und 38.1.** Die Mäuse wurden 21 Tage lang mit Imipramin-HCl (10 mg/kg; i. p., 2 x täglich) oder Lösungsmittel (Kontrollen) behandelt. Danach wurden die definierten Gehirnteile präpariert, in Aufschlusspuffer homogenisiert und die Luciferase-Aktivität gemessen. Die angegebenen Luciferase-Aktivitäten beziehen sich jeweils auf die zugehörige Kontrolle, deren absoluter Wert als 100% definiert wurde. Die Aktivitäten sind Mittelwerte und SEMs aus 12 Tieren mit Doppelbestimmungen. \*, signifikante Differenz ( $p < 0,05$ ) im Vergleich zur Kontrollgruppe.

### **3.4.3 Wirkung einer Dauerbehandlung mit dem Antidepressivum Fluoxetin auf die Expression des Reportergens in 4xCRE-Luc-transgenen Mäusen in vivo**

Fluoxetin gehört zu der Arzneimittelgruppe der selektiven Serotonin-Wiederaufnahmehemmer (SSRI). Es wurde hier die Wirkung einer dauerhaften Behandlung mit Fluoxetin auf die Expression des Reportergens untersucht. Die transgenen Tiere bekamen 21 Tage lang (10mg/kg, i. p., 1 x täglich) Fluoxetin-HCl (siehe 2.30.1) oder das Lösungsmittel (Kontrollen). Abb. 16 zeigt, daß die dauerhafte Fluoxetin-Behandlung die Expression des Reportergens in Pons um 30%, im Hippocampus um 31% und im Cortex um 29% senkte.

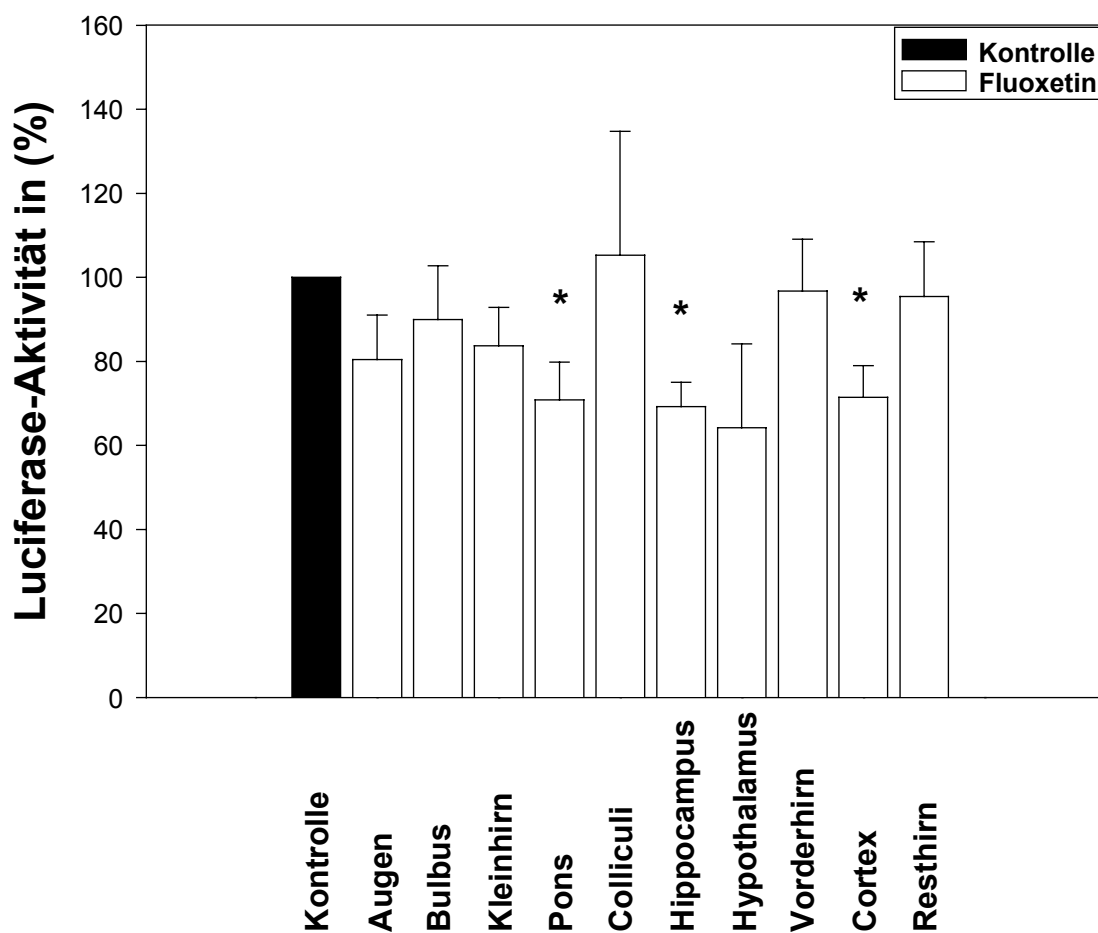


Abb.16: **Wirkung einer chronischen Behandlung mit Fluoxetin auf die Expression des Reportergens in Gehirnarealen 4xCRE-Luc-transgener Mäuse der Linie 38.1.** Die Mäuse wurden 21 Tage lang mit Fluoxetin-HCl (10 mg/kg; i. p., 1 x täglich) oder das Lösungsmittel (Kontrollen) behandelt. Danach wurden die Gehirnteile präpariert, in Aufschlusspuffer homogenisiert und die Luciferase-Aktivität gemessen. Die angegebenen Luciferase-Aktivitäten beziehen sich jeweils auf die zugehörige Kontrolle, deren absoluter Wert als 100% definiert wurde. Die Aktivitäten sind Mittelwerte und SEMs aus 7 Tieren mit Doppelbestimmungen. \*, signifikante Differenz ( $p < 0,05$ ) im Vergleich zur Kontrollgruppe.

#### **3.4.4 Wirkung einer Dauerbehandlung mit dem Antidepressivum Desipramin auf die Expression des Reportergens in 4xCRE-Luc-transgenen Mäusen in vivo**

Desipramin gehört zu den trizyklischen Antidepressiva. Es blockiert ganz bevorzugt die neuronale Wiederaufnahme von Noradrenalin. Es wurde die Wirkung einer 21 Tage langen Desipramin-Behandlung (10mg/kg, i. p., 2 x täglich; siehe 2.30.1) oder das Lösungsmittel (Kontrollen) von 4xCRE-Luc-transgenen Mäusen auf die Expression des Reportergens untersucht. Wie es der Abb. 17 zu entnehmen ist, zeigte die chronische Desipramin-Behandlung keine Wirkung auf die Expression des Reportergens.

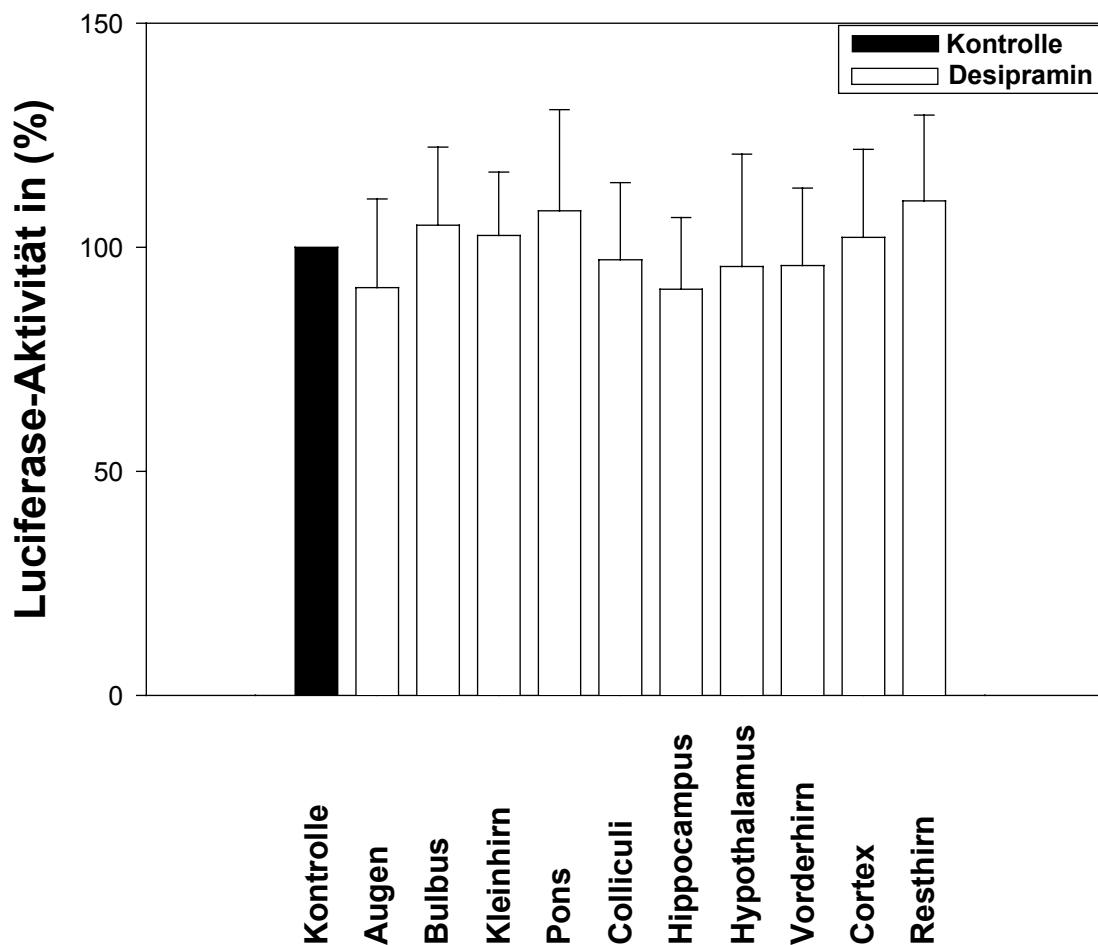


Abb.17: **Wirkung einer chronischen Behandlung mit Desipramin auf die Expression des Reportergens in Gehirnarealen 4xCRE-Luc-transgener Mäuse der Linie 38.1.** Die Mäuse wurden 21 Tage lang mit Desipramin-HCl (10 mg/Kg; i. p., 2 x täglich) oder das Lösungsmittel (Kontrollen) behandelt. Danach wurden die Gehirnteile präpariert, in Aufschlusspuffer homogenisiert und die Luciferase-Aktivität gemessen. Die angegebenen Luciferase-Aktivitäten beziehen sich jeweils auf die zugehörige Kontrolle, deren absoluter Wert als 100% definiert wurde. Die Aktivitäten sind Mittelwerte und SEMs aus 9 Tieren mit Doppelbestimmungen.

### **3.5 Wirkung von psychosozialem Streß bzw. psychosozialem Streß und Imipramin auf die Expression des Reportergens in 4xCRE-Luc-transgenen Mäusen in vivo**

#### **3.5.1 Wirkung von chronischem psychosozialem Streß auf die Expression des Reportergens in 4xCRE-Luc-transgenen Mäusen in vivo**

Antidepressiva wirken typischerweise nur bei depressiven Patienten stimmungsaufhellend, nicht jedoch bei Gesunden (Estler, 2000). Deshalb sollte an einem Tiermodell der Depression untersucht werden, ob die CRE-vermittelte Transkription in diesem Tiermodell der Depression verändert ist und ob diese Veränderung durch Behandlung mit Antidepressiva korrigiert werden kann. Bei diesem Versuch wurden die 4xCRE-Luc-transgenen Mäuse einem chronischen psychosozialen Streß (Depressionsmodell) ausgesetzt (siehe 2.29). Abb. 18 zeigt, daß der psychosoziale Streß eine Erhöhung der Expression des Reportergens in allen Hirnregionen verursachte. Diese Erhöhung ist in den folgenden Regionen statistisch signifikant: Kleinhirn um 48%, Pons um 36%, Colliculi um 139%, Hippocampus um 56%, Vorderhirn um 34% und im Cortex um 48%.

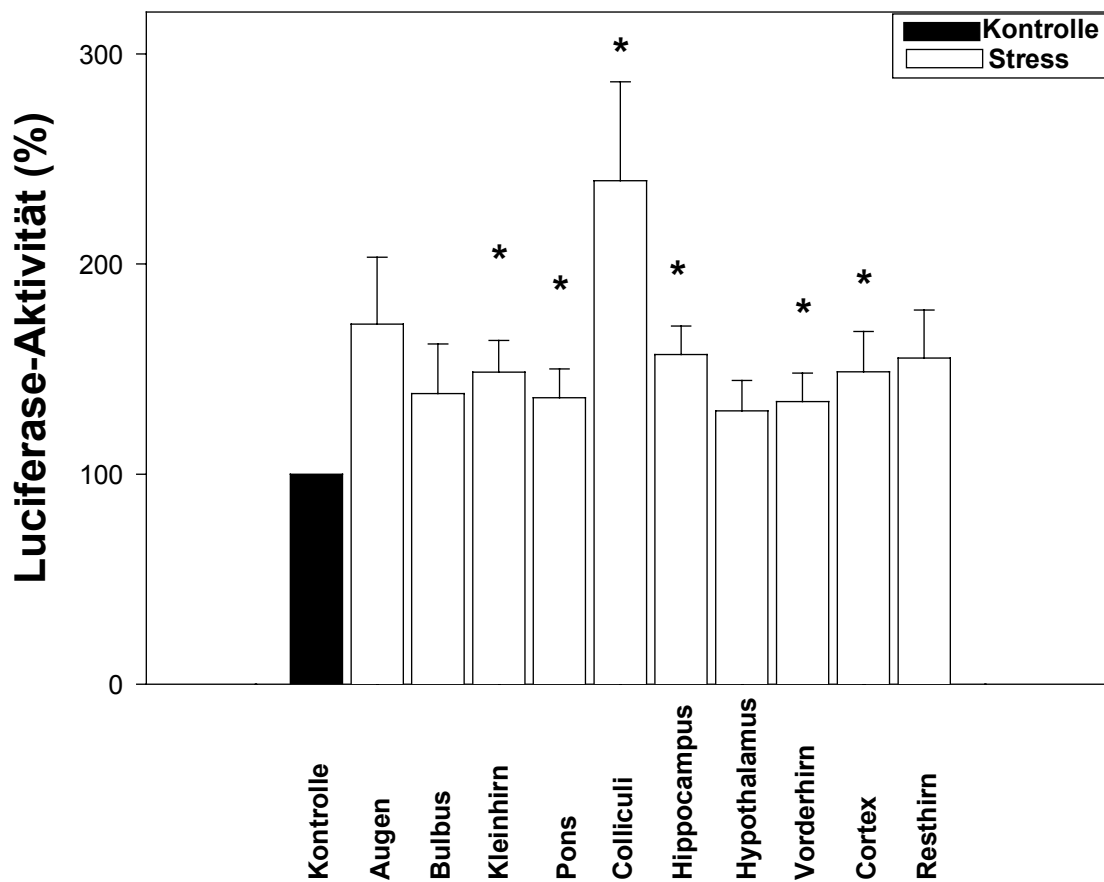


Abb.18: **Wirkung von psychosozialen Stress auf die Expression des Reportergens in Gehirnarealen 4xCRE-Luc-transgener Mäuse der Linie 38.1.** Die Mäuse wurden 21 Tage lang dem psychosozialen Stress ausgesetzt. Die Kontrolltiere wurden stressfrei getrennt gehalten. Danach wurden die Gehirnteile präpariert, in Aufschlusspuffer homogenisiert und die Luciferase-Aktivität gemessen. Die angegebenen Luciferase-Aktivitäten beziehen sich jeweils auf die zugehörige Kontrolle, deren absoluter Wert als 100% definiert wurde. Die Aktivitäten sind Mittelwerte und SEMs aus 7 Tieren mit Doppelbestimmungen. \*, signifikante Differenz ( $p < 0,05$ ) im Vergleich zur Kontrollgruppe.



### 3.5.2 Wirkung von chronischem psychosozialen Streß und Imipramin auf die Expression des Reportergens in 4xCRE-Luc-transgenen Mäusen in vivo

Bei diesem Versuch wurde eine Tendenz zur Erniedrigung der Luciferase-Aktivität in allen untersuchten Gehirnteilen beobachtet (Abb. 19). Diese Erniedrigung der Expression des Reportergens ist in folgenden Hirnregionen statistisch signifikant: Pons um 23%, Colliculi um 21%, Hippocampus um 27%, Hypothalamus um 26%, Vorderhirn um 26% und Cortex um 19% (Abb. 19).

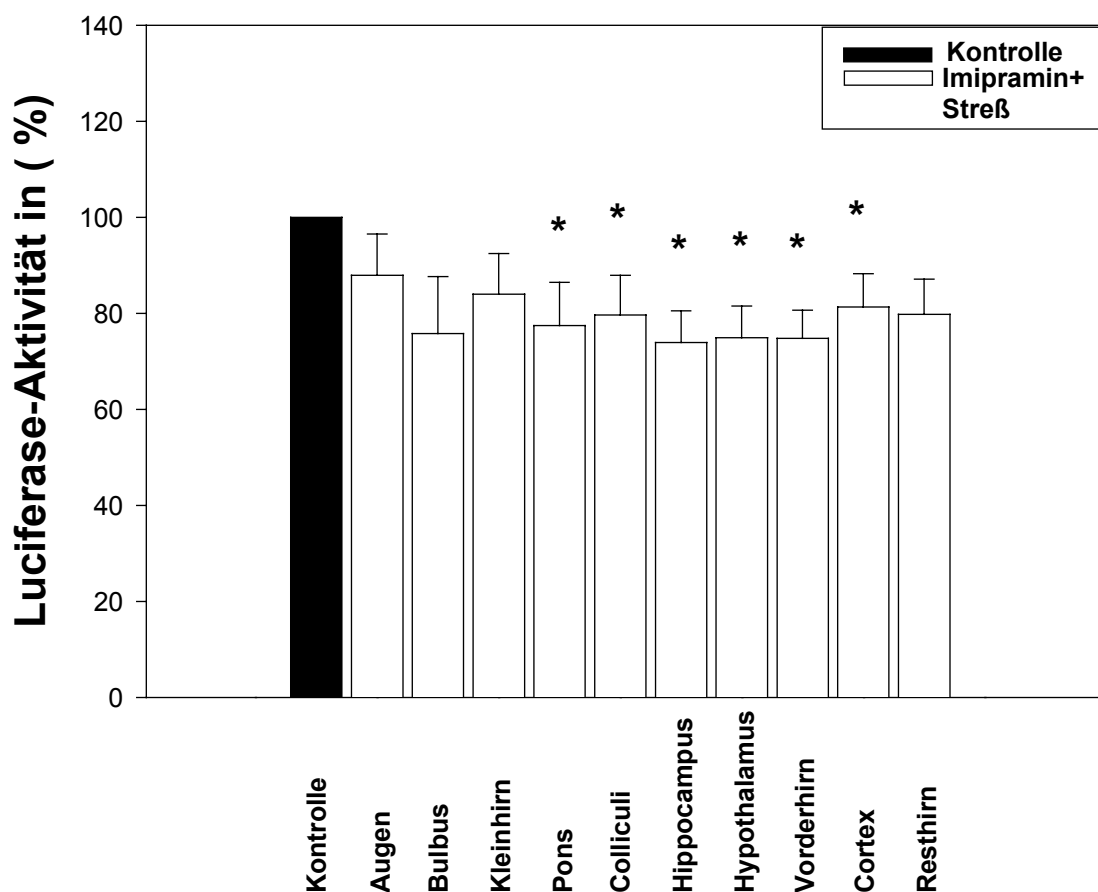


Abb.19: **Wirkung von psychosozialen Streß und Imipramin auf die Expression des Reportergens in Gehirnarealen 4xCRE-Luc-transgener Mäuse der Linie 38.1.** Die Mäuse wurden 25 Tage lang dem psychosozialen Streß ausgesetzt und ab dem 5. Tag chronisch mit Imipramin-HCl für 21 Tage (10 mg/kg; i. p., 2 x täglich) behandelt. Die Kontrolltiere wurden streßfrei getrennt gehalten und mit dem Lösungsmittel behandelt. Danach wurden die

Gehirnteile präpariert, in Aufschlusspuffer homogenisiert und die Luciferase-Aktivität gemessen. Die angegebenen Luciferase-Aktivitäten beziehen sich jeweils auf die zugehörige Kontrolle, deren absoluter Wert als 100% definiert wurde. Die Aktivitäten sind Mittelwerte und SEMs aus 9 Tieren mit Doppelbestimmungen. \*, signifikante Differenz ( $p < 0,05$ ) im Vergleich zur Kontrollgruppe.

### **3.6 Wirkung von psychosozialem Streß bzw. psychosozialem Streß und Imipramin auf das Körpergewicht der untersuchten 4xCRE-Luc-transgenen Mäuse**

#### **3.6.1 Wirkung von dauerhaftem psychosozialem Streß auf das Körpergewicht der untersuchten transgenen Mäuse**

Es wurde die Wirkung des Streßes auf das Körpergewicht der Mäuse untersucht. Hier wurden die dem dauerhaften psychosozialen Streß ausgesetzten Mäuse (siehe 2.29) vor und nach dem Versuch gewogen. Wie in Abb. 20 zu sehen, konnte von dauerhaftem psychosozialem Streß keine statistisch signifikante Wirkung auf das Körpergewicht der Mäuse beobachtet werden.

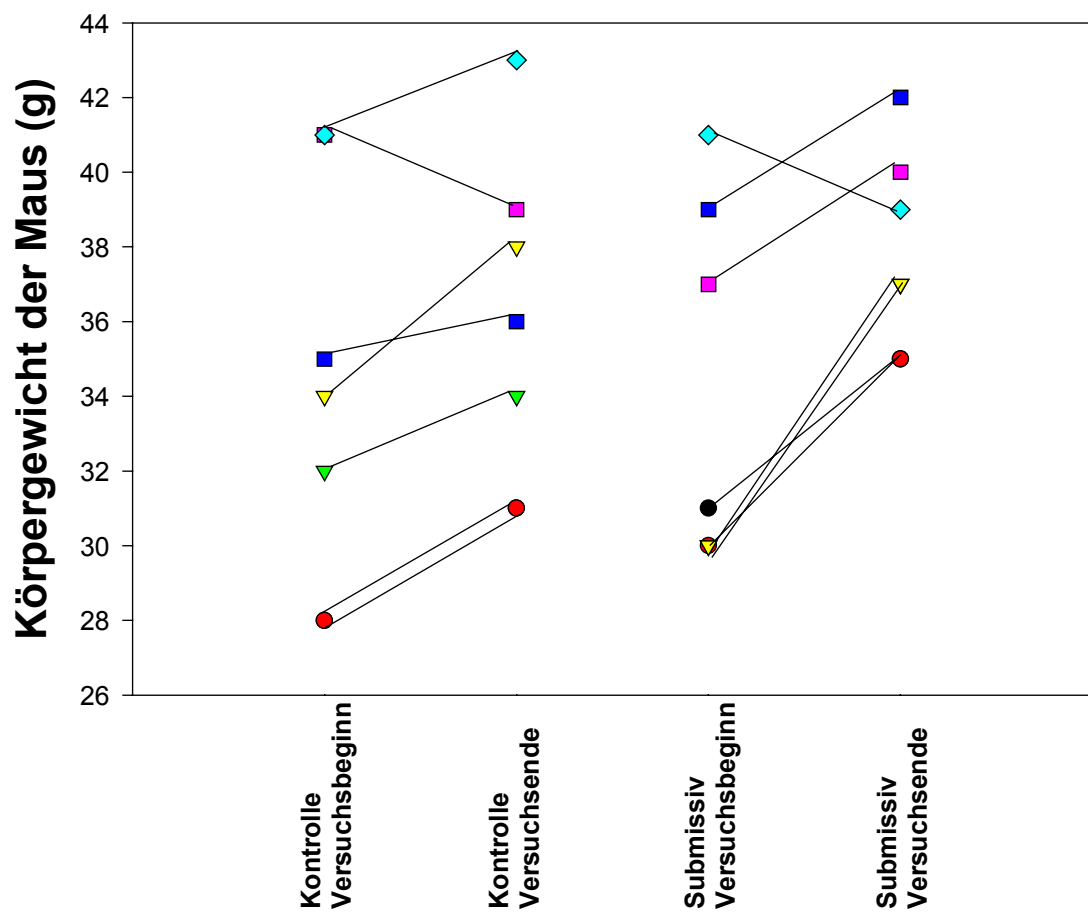


Abb.20: Einfluß von psychosozialen Stress auf das Körpergewicht 4xCRE-Luc-transgener Mäuse der Linie 38.1. Versuchs- und Kontrolltiere (siehe Abb. 18) wurden am Versuchsbeginn am Versuchsende gewogen.

### 3.6.2 Wirkung von psychosozialen Streß und Imipramin auf das Körpergewicht der untersuchten 4xCRE-Luc-transgenen Mäuse

Es wurde hier die Wirkung des psychosozialen Streßes (2.29) und Imipramin (2.30.1) auf das Körpergewicht der Mäuse untersucht. Es konnte von dauerhaftem psychosozialen Streß und dauerhafter Imipramin-Behandlung keine statistisch signifikante Wirkung auf das Körpergewicht der Mäuse beobachtet werden (Abb. 21).

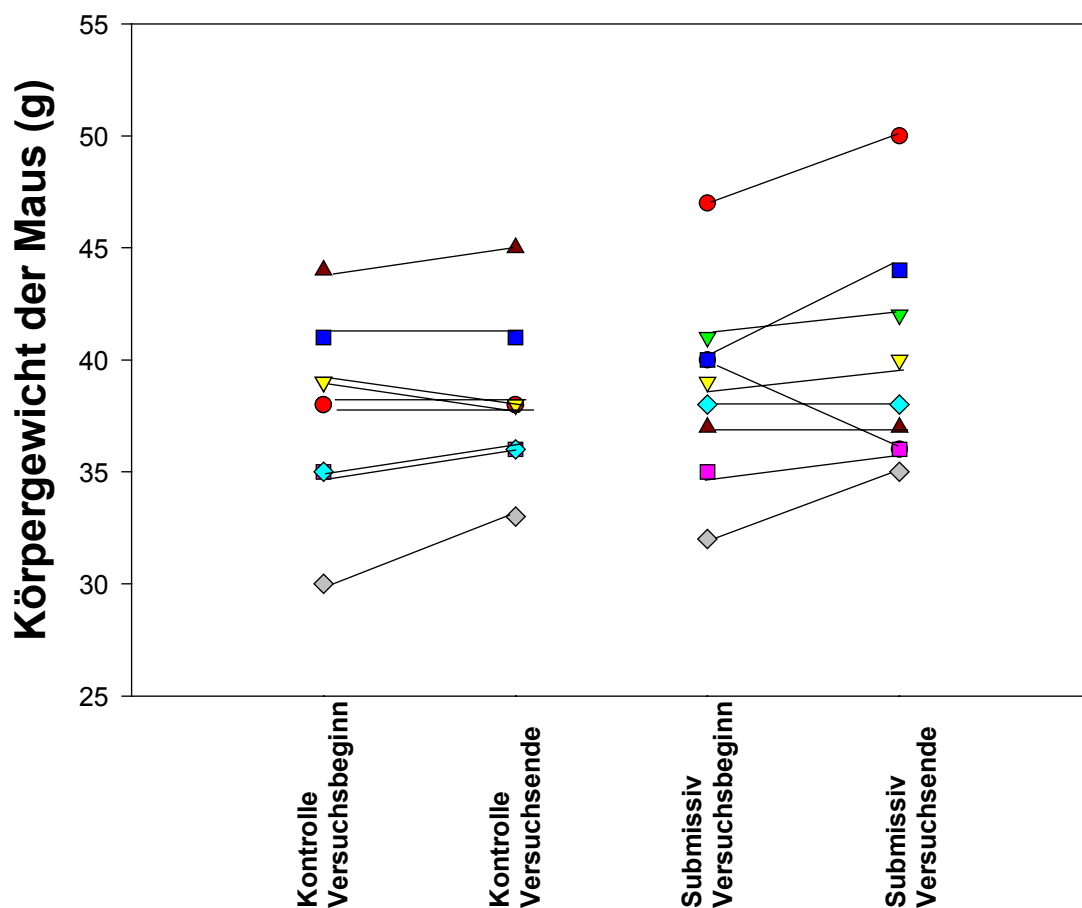


Abb.21: Einfluß von psychosozialen Streß und Imipramin auf das Körpergewicht 4xCRE-Luc-transgener Mäuse der Linie 38.1. Versuchs- und Kontrolltiere (siehe Abb. 19) wurden am Versuchsbeginn und am Versuchsende gewogen.

## 4. Diskussion

### 4.1 4xCRE-Luc-transgene Mäuse zur Untersuchung der CRE-vermittelten Transkription in vivo

In den letzten 30 bis 35 Jahren hat sich die Biotechnologie so stark weiterentwickelt, daß man in Zellen zusätzliche Gene einfügen und Gene überexprimieren oder auch abschalten kann. Die Beherrschung dieser Technologie ist für das Verständnis regulatorischer Systeme, für Krankheitsmodelle und für die Entwicklungsbiologie von enormer Bedeutung. Die Zellkultur-techniken erlauben Aussagen über einzelne Zellen, die aber nicht unbedingt generalisiert werden können. Deshalb lag es nahe zu versuchen, die Gentransfertechnologie für ganze Organismen weiterzuentwickeln. Erste Arbeiten wurden an kleinzelligen Objekten durchgeführt. Später kamen Objekte wie *Drosophila* hinzu (Spradling und Rubin, 1982). Ein wesentlicher Schritt in Richtung auf das Verständnis und das Beherrschen der Technik des Integrierens zusätzlicher Gene in ein Säugetier gelang Palmiter und Mitarbeitern (Palmiter et al., 1982). Transgene Mausmodelle sind ein wertvoller Bestandteil der biomedizinischen Grundlagenforschung. Oft werden transgene Mäuse eingesetzt, um regulatorische Sequenzen (Enhancer, Promotoren) zu untersuchen und um ihre physiologischen Funktionen in vivo zu studieren. Dazu wird die zu untersuchende Sequenz mit einem Reportergen gekoppelt, mit Hilfe dessen die Aktivität des Transgens in den verschiedenen Geweben, Organen und Zellen der transgenen Tiere nachgewiesen werden kann.

Die Wirkung von Antidepressiva auf die CREB/CRE-vermittelte Transkription wurde in der vorliegenden Arbeit am Tier in vivo überprüft. Hierzu wurden transgene Mauslinien etabliert, in denen 4 Kopien des CREs vor dem minimalen Thymidin-Kinase-Promotor des Herpes-Simplex-Virus die Expression des Reportergens Luciferase steuern (siehe 3.1). Bei der Analyse von Organen adulter Mäuse wurden die höchsten Luciferaseaktivitäten im Gehirn, jedoch in der Peripherie praktisch keine Luciferaseaktivität gemessen (Abb. 3 und 4). Es ist unklar, warum die Luciferase in Peripherie nicht exprimiert. Eine Analyse des Gehirns zeigte hohe Luciferaseaktivität im Cortex, Hippocampus, Colliculi, Pons, Vorderhirn und Cerebellum (Abb. 3 und 4). Die Nachteulebilder-Analyse zeigte höchste Luciferaseaktivitäten in Cortex, Corpus callosum, Commissura anterior, Fimbria und Hippocampus (Abb. 5, 6 und

7). Veratridin ist ein Aktivator spannungsabhängiger Natrium-Kanäle und TTX ist ein Blocker spannungsabhängiger Natrium-Kanäle. Die Expression des Reportergens in coronaren nativen Gehirnschnitten der 4xCRE-Luc-transgenen Mäuse wurde durch Veratridin dosis- und zeitabhängig gehemmt (Abb. 11 und 12). TTX hat den Veratridin-Effekt ganz aufgehoben (siehe Abb. 13). Warum Veratridin die Expression des Reportergens hemmt, ist unklar und wurde bislang nicht weiter untersucht. Da Veratridin auf erregbare Zellen wirkt, ist Wirkung von Veratridin auf Luciferase-Expression aber ein Hinweis auf eine neuronale Lokalisation der Luciferase. Monoaminerge Neurone sind im limbischen System, Striatum und Cortex weit verteilt (Drevets, 2000; Graybiel, 1990; Drevets et al. 1999) und diese Regionen werden im Zusammenhang mit der Pathophysiologie von Depressionen diskutiert (Duman et al., 1999). Die meisten 5-HT-enthaltenden Neurone sind entlang der Mittellinie des Gehirnstammes lokalisiert. Diese senden lange Axone, deren breite Verteilung in empfangenden Arealen im Nervensystem von Rückenmark bis Cortex präsentiert ist. Serotonin im Vorderhirn wird fast ganz von Neuronen produziert, deren Zellkörper in den dorsalen und medianen Raphekernen des Mittelhirns lokalisiert sind. Zu den Prominenten Vorderhirn-Terminalregionen gehören Hypothalamus, Cortex, Hippocampus, Amygdala und Striatum. Außerdem sind die 5-HT-Neurone stark verzweigt, weshalb sie für die gleichzeitige Beeinflussung der Funktion verschiedener Regionen des Zentralnervensystems geeignet sind (Dahlstrom und Fuxe 1964; Jacobs und Azmitia 1992). Diese Nervenmuster sind in Säugetierspezies einschließlich Mensch relativ konserviert (Dahlstrom und Fuxe 1964; Jacobs und Azmitia 1992).

Aus diesen Ergebnissen folgern wir, daß die 4 Kopien des CREs die Expression des Reportergens im Gehirn dirigieren. Dies erlaubt uns die Untersuchung der CRE-Regulation im Gehirn.

#### **4.2 Chronische, aber nicht akute, Behandlung mit Antidepressiva hemmt die Expression des CRE-abhängigen Reportergens substanzspezifisch in vivo**

In den vorliegenden in vivo Versuchen sollte untersucht werden, welche Wirkung Antidepressiva auf die Expression des CRE-abhängigen Reportergens haben. Nach chronischer Behandlung der 4xCRE-Luc-transgenen Mäuse mit Imipramin oder Fluoxetin kam es zu einer Hemmung der Expression des CRE-abhängigen Reportergens. Die chronische

Imipramin-Behandlung hat die Expression des CRE-abhängigen Reportergens in Hippocampus und in Pons (siehe 3.4.2), die chronische Fluoxetin-Behandlung in Hippocampus, Pons und Cortex gehemmt (siehe 3.4.3). Dagegen hatte die chronische Desipramin- (siehe 3.4.4) bzw. die akute Imipramin-Behandlung (siehe 3.4.1) keine Wirkung auf die Expression des CRE-abhängigen Reportergens gezeigt. Die Ergebnisse in der vorliegenden Arbeit zeigen den regionen-spezifischen Effekt der Antidepressiva auf die Expression des CRE-abhängigen Reportergens. Dieser Effekt wurde nach chronischer, aber nicht akuter Behandlung erkennbar. Außerdem ist dieser Effekt substanz-spezifisch, weil bekannt ist, daß Imipramin die Wiederaufnahme von Noradrenalin und Serotonin gleichermaßen aus dem synaptischen Spalt in die Nervenenden hemmt, während Desipramin relativ selektiv Noradrenalin, Fluoxetin hingegen selektiv Serotonin hemmt (Mutschler, 1996). Daher wird angenommen, daß die Wirkung der Antidepressiva hier mehr über das Serotonin-System vermittelt wird. Es ist bekannt, daß die klinische Wirkung von Antidepressiva sich unter fortgesetzter Therapie erst mit einer Verzögerung von 1-3 Wochen einstellt (Schwaninger et al., 1995b).

Mehrere Nachweislinien zeigten, daß CREB ein Schlüssel der nuklären transkriptionellen Aktivität in Synapsen ist. Synaptische Stimulation sowie in vitro Versuche mit Neurotransmittern lösten CREB-Phosphorylierung an Ser-119 (in CREB-327) aus (Vanhoutte et al., 1999; Ginty et al., 1993). Viele Gene zeigen nach erhöhter neuronaler Aktivität gesteigerte Transkription, darunter c-fos (Berkowitz et al., 1989), zif/268 (Alexandre et al., 1991), Somatostatin (Montminy et al., 1986) und BDNF (Shieh et al., 1998; Tao et al., 1998). Sie besitzen in ihren regulatorischen Abschnitten CREB-Bindungsstellen. Die Aktivierung von Synapsen konnte die Transkription eines CRE-lacZ-Transgens in vivo erhöhen (Impey et al., 1996; Pham et al., 1999). Außerdem erscheint CREB für langfristige Gedächtnis-Funktion entscheidend zu sein. Injektion von entweder CRE-Oligonukleotiden oder CREB-Antikörper in die präsynaptischen Kerne der Aplysia-Sinnesneurone blockiert die langfristige Facilitation (Dash et al., 1990; Bartsch et al., 1995; Bartsch et al., 1998). Ebenso modulieren eine Induktion der Repressor- oder Aktivator-Formen des dCREBs langfristige Gedächtnis-Funktion in Drosophila (Tully et al., 1994; Yin et al., 1994). Außerdem sind spätere Phasen der hippocampalen LTP (long-term potentiation) und langfristiges spezielles Gedächtnis in  $\alpha/\beta$ -CREB-Isoformen-fehlenden Mäusen abgeschwächt (Bourtchuladze et al., 1994).

Inhibition der Aktivität der CREB-Bindung an die DNA blockiert die entscheidende Phase der LTD (long-term depression) in Kleinhirnpurkinjenzellen (Ahn et al., 1999). Somit aktivieren Neurotransmitter die CREB-abhängige Transkription und die CREB-Aktivität ist entscheidend für die dauerhafte Aktivitäts-abhängige Zunahme bzw. Abnahme der synaptischen Stabilität sowie Lernfähigkeit.

Die 4xCRE-Luc-transgenen Mäuse in der vorliegenden Arbeit tragen das in ihrem Transgen CRE-Element des Somatostatingens, mit der Konsensus Oktamer-Sequenz 5'-TGACGTCA-3' (Schwaninger et al., 1995b). Das hier verwendete CRE-Element des Somatostatingens ist in transienten Transfektionen gut charakterisiert worden und verfügt über eine hohe Bindungsaffinität zum CREB (Schwaninger et al., 1993b, 1995a; Montminy et al., 1986). Die transkriptionelle Aktivität von CREB ist von seiner Phosphorylierung an Ser-119 (in CREB-327) abhängig. Tierversuchsstudien legen nahe, daß eine Zunahme der Neurotransmission an postsynaptischen 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptoren den therapeutischen Effekt verschiedener Antidepressiva vermitteln können (De Montigny and Aghajanian, 1978; Blier et al., 1987; Blier et al., 1990). Im Falle der selektiven Serotonin-Wiederaufnahmehemmer wird dieser Effekt durch Desensibilisierung des Zellkörpers der 5-HT<sub>1A</sub>-Autorezeptoren erklärt. Einige Nagetier-Studien erklären das mit der Abnahme der 5-HT<sub>1A</sub>-Autorezeptorbindung im Raphekern (Welner et al., 1989; Li et al., 1994), obwohl andere keine Änderung der 5-HT<sub>1A</sub>-Autorezeptorbindung in dieser Region beobachten konnten (Hensler et al., 1991; Jolas et al., 1994; Le Poul et al., 1995). Pharmakologische Stressversuche in Menschen lieferten auch einen indirekten Nachweis, daß langfristige Behandlung mit Serotonin-Wiederaufnahmehemmer die funktionelle Responsivität der 5-HT<sub>1A</sub>-Autorezeptoren erniedrigt haben (Lesch et al., 1991; Sargent et al., 1997).

Zahlreiche Gene, deren Expression durch Antidepressiva-Behandlung moduliert wird, zeigen potentielle Bindungsstellen für CREB/ATF1/CREM in ihrer Promotorregion. So enthält die 5'-flankierende Region der Serotonintransporter u.a. CRE-Motive (Bengel et al., 1997) und es wurde berichtet, daß chronische Fluoxetin-Behandlung ihre Expression vermindert (Neumaier et al., 1996). CRE Consensus Sequenzen sind auch in regulatorischen Regionen der Serotonin 5-HT<sub>1A</sub>- und 5-HT<sub>2</sub>-Rezeptorgene vorhanden (Zhu et al., 1995). 5-HT-1A-Rezeptoren stehen mit chronischer Antidepressiva-Behandlung in Wechselbeziehung (De Montigny et al., 1990). Li et al. (Li et al., 1993) beobachteten in Ratten nach langfristiger



Fluoxetin-Behandlung (21 Tage), nicht aber nach Desipramin-Behandlung, im Hypothalamus eine abnehmende Funktion der 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptoren. Die Dichte der 5-HT<sub>2</sub>-Rezeptoren hat nach chronischer Antidepressiva-Behandlung abgenommen (Peroutka und Snyder 1980). Es wurde vorgeschlagen, daß Störung der zentralen Serotonin 5-HT<sub>2</sub>-Rezeptoren an der Biochemie und Pathologie der Depression beteiligt ist, und daß diese Störungen mit Antidepressiva korrigiert werden können (Jagadeesh und Subhash, 1998). Jagadeesh und Subhash fanden in Synaptosomen des humanen Frontalcortex nach Behandlung mit Antidepressiva außerdem eine Abnahme der intrazellulären Calcium-Konzentration.  $\beta$ 1-Adrenerge Rezeptoren, Tyrosinhydroxylase und corticotropin-freisetzender Faktor, die in ihren Promotoren CREs besitzen (Kilbourne et al., 1992; Collins et al., 1993; Spengler et al., 1992), zeigten nach Antidepressiva-Behandlung eine reduzierte Expression (Nestler et al., 1990; Brady et al., 1991; Hosoda und Duman, 1993).

Aus diesen Ergebnissen folgern wir, daß eine chronische, aber nicht akute, Antidepressiva-Behandlung die CRE-gesteuerte Transkription substanzspezifisch hemmt.

#### **4.3 Psychosozialer Streß erhöht die Expression des Reportergens in 4xCRE-Luc-transgenen Mäusen in vivo**

Das Ziel der weiteren Versuche war, die Wirkung der Antidepressiva auf die Expression des CRE-abhängigen Reportergens in Tieren, die psychosozialem Streß ausgesetzt waren, in vivo zu untersuchen, weil diese Arzneimittelgruppe ihre Wirkung nur an Depressiven, aber nicht an Gesunden zeigt. Durch psychosozialen Streß als Tiermodell der Depression konnten in submissiven 4xCRE-Luc-transgenen Mäusen eine tendenzielle Erhöhung der Expression des CRE-abhängigen Reportergens in allen untersuchten Gehirnarealen beobachtet werden (siehe 3.5.1). Der psychosoziale Streß induzierte in den folgenden Arealen eine statistisch signifikante Erhöhung der Expression des CRE-abhängigen Reportergens: Kleinhirn, Pons, Colliculi, Hippocampus, Vorderhirn und Cortex (siehe 3.5.1). Es ist angesichts der zahlreichen pathologischen Depressionssyndrome, die beim Menschen beschrieben sind unwahrscheinlich, daß die Tiermodelle jemals menschliche Depressionszustände exakt widerspiegeln können. Doch die hier in diesem Tiermodell der Depression berücksichtigten Kriterien könnten in gewisser Art und Weise Ähnlichkeit zu den humanen Depressionen

zeigen (Kudryavtseva et al., 1991). Transkriptionsfaktoren, wie z.B. CREB, werden durch Steigerung der elektrischen Aktivität innerhalb einer Zelle aktiviert und vermögen innerhalb der selben Zelle die Gentranskription zu verändern (Ghosh et al., 1994; Sheng und Greenberg, 1990). Somit können Untersuchungen von Transkriptionsfaktoren in Verbindung mit spezifischem Verhalten (z.B. psychosozialer Streß) einen indirekten Nachweis für neuronale Aktivität während eines Verhaltens liefern. Der hypersomatische Streß z. B. induzierte in Ratten eine Erhöhung an phosphoCREB (McCabe und Burrell, 2001). Chronischer Streß erhöhte in LC-Neuronen (LC= locus coeruleus) die Aktivität der Tyrosinhydroxylase (Thoenen, 1970; Zigmond et al., 1974; Stone et al., 1978; Richard et al., 1988) und die Phosphorylierung von CREB (Sabban und Kvetnansky, 2001). In depressiven Menschen war in präfrontalem Cortex phosphoCREB erhöht (Odagaki et al., 2001). Viele pharmakologische Studien haben angeregt, daß in der Synapse freigesetzte Neurotransmitter spezifische Rezeptoren, rezeptor-gesteuerte Ionenkanäle und spannungsabhängige Ionenkanäle aktivieren. Aktivierung von L-Typ spannungsabhängigen Calcium-Kanälen (L-VDCCs: L-type voltage-dependent  $\text{Ca}^{2+}$ -channels) führte zu Expression verschiedener Gene in PC12, in primären Neuronkulturen von: Cortex, Hippocampus, Striatum, und Cerebellum und sowie in Neuronen von Hippocampus und Cortex auf Objektträger (Greenberg et al., 1986; Murphy et al., 1991; Lerea et al., 1992; Bading et al., 1993; Impey et al., 1996; Tao et al., 1998; Shieh et al., 1998). Die L-typ Calcium-Kanäle wurden in hoher Dichte in proximalen Dendriten und Zellkörper gefunden und ihre Öffnung führte zu einer Zunahme der cytosolischen und nukleären Calcium-Konzentration (Westenbroek et al., 1990). Somit werden z. B. nach Aktivierung hippocampaler Synapsen die Calcium-Levels überall im Neuron einschließlich der Zellkörper und im Kern erhöht (Regehr et al., 1989). Deisseroth et al. (Deisseroth et al., 1996) fanden in primärkultivierten Hippocampus-Zellen, daß die Calcium-abhängige nukleäre CREB-Phosphorylierung mit langpotentiellen Synapsen-Stimuli schnell induziert wurde. Die Ergebnisse dort unterstützen die Idee, daß die nukleäre CREB-Phosphorylierung mehr durch die  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin-abhängige Proteinkinase begünstigt wird als durch cAMP/PKA (Deisseroth et al., 1996). Die Aktivierung und Phosphorylierung von CREB durch Membrandepolarisation stützt sich auf den  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom durch L-Typ VDCC (Schwaninger et al., 1993a; Sasaki et al., 2000). Depolarisation öffnet auch den spannungsabhängigen Natrium-Kanal und ermöglicht die Änderung von intrazellulärer  $\text{Na}^{+}$ -Konzentration, was zur

Aktivierung des  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers führt, was einen übermäßigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom verursacht (Koch und Barish, 1994). Tanaka et al. (Tanaka et al., 2000) fanden, daß die Zunahme der CREB-Phosphorylierung in Ratten sich auf die Aktivierung von  $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^+$  stützt, was zum  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom führt. Schwaninger et al. (Schwaninger et al., 1995b) hat in HIT Zellen gezeigt, daß Antidepressiva die durch Membran-Depolarisation induzierte Calcium-Konzentrations-Erhöhung und die Phosphorylierung von CREB hemmen. Thompson et al. lieferten einen Hinweis darauf, daß CREB direkt nach der Membrandepolarisation an Ser-119 (in CREB-327) durch Calcium-aktivierte Kinasen phosphoryliert wird und eine aktivierte Proteinkinase A sich an der Calcium-aktivierten CREB/CRE-Gentranskription beteiligen kann (Thompson et al., 1995). Es ist heute bekannt, daß mehrere Stimulus-abhängige Proteinkinasen an der CREB-Phosphorylierung beteiligt sind: PKA (Gonzalez und Montminy, 1989); CaMKI, II und IV (Sheng et al., 1991; Dash et al., 1991; Sun et al., 1994); Rsk1, 2 und 3 (Xing et al., 1996; Impey et al., 1998); MAPK $\alpha$  Kinase 2 (Tan et al., 1996); Akt/PKB (Du und Montminy, 1998); p70 S6K (De Groot et al., 1994); p38/RK/HOG-1-dependent p 108 CREB-Kinase (Iordanov et al., 1997) und MSK1 (Deak et al., 1998). Jede dieser Kinasen kann von einem oder mehreren extrazellulären Stimuli aktiviert werden und jede kann in vitro CREB an Ser-119 phosphorylieren. In den meisten Fällen ist die aktive Kinase im Kern lokalisiert. Es wird vermutet, daß verschiedene CREB-Kinasen nach Zellstimulation aktiviert werden und die Art der Stimuli, das Ausmaß und Dauer der Stimulation, und die Nähe des Zelloberflächenrezeptors und seine Signaleffektoren auf den Kern und die transkriptionelle Maschinerie koordinierend bestimmen, welche der CREB-Kinase(n) für die CREB-Phosphorylierung verantwortlich ist (Ahn et al., 2000). Interessanterweise ist die Phosphorylierung von CREB an Ser-119 alleine für Transkriptions-Aktivierung nicht ausreichend (Ginty et al., 1994; Sun et al., 1994; Enslen et al., 1994; Schwaninger et al., 1995a; Thompson et al., 1995; Bonni et al., 1995; Liu und Graybiel, 1996) und die Dauer der Phosphorylierung von CREB nach Zellstimulation ist bestimmend dafür ob ein Stimulus CREB-vermittelte Gentranskription aktivieren kann. An Ser-119 phosphoryliertes CREB rekrutiert die Co-Aktivatoren CBP (CREB binding protein) und p300 (Chrivia et al., 1993), welche spezifische Histon-Acetyltransferase-Aktivität haben (Ogryzko et al. 1996; Bannister und Koukarides, 1996). Nach deren Rekrutierung zum Promotor fördern CBP und p300 die Transkription-Initiierung durch direkte Interaktionen mit Komponenten der

basalen Transkriptionsmaschinerie sowie durch Acetylierung von Histonen. Es wird angenommen, daß Histon-Acetylierung Chromatin decondensiert und den Eintritt der basalen Transkriptionsfaktoren zum Kern der Promotorregion ermöglicht.

Die Erhöhung der Expression des CRE-abhängigen Reportergens durch chronischen psychosozialen Streß weist auf eine gesteigerte CRE-vermittelte Transkription als Folge der veränderten neuronalen Aktivität in diesem Tiermodell der Depression hin.

#### **4.4 Imipramin hemmt in Mäusen, die psychosozialen Streß ausgesetzt waren, die Expression des CRE-abhängigen Reportergens**

Da Antidepressiva nur im depressiven Zustand wirken, sollte die Wirkung von Imipramin in Mäusen, die psychosozialen Streß ausgesetzt waren, auf die Expression des CRE-abhängigen Reportergens untersucht werden. In allen untersuchten Arealen des Gehirns der submissiven 4xCRE-Luc-transgenen Maus wurde eine tendenzielle Abnahme der Luciferase-Reportergen-Aktivität (siehe 3.5.2) festgestellt. Diese Abnahme war in Pons, Colliculi, Hippocampus, Hypothalamus, Vorderhirn und Cortex statistisch signifikant (siehe 3.5.2). Die durch den psychosozialen Streß verursachte Erhöhung der Expression des Reportergens konnte somit durch Imipramin-Behandlung unterdrückt werden (siehe 3.5.2). Die Methoden und Ergebnisse der vorliegenden Arbeit liefern ein nützliches Mittel für die Weiterentwicklung und das Verstehen des Wirkungsmechanismus von Antidepressiva. Dies vor allem, weil bis jetzt viele Tierversuche mit Antidepressiva an Tieren durchgeführt wurden, die entweder überhaupt keinem (Thome et al., 2000), oder wenig geeigneten Depressions-Modellen (Katz, 1981; Katz et al., 1981) ausgesetzt waren. Die hier im angewandten Tiermodell der Depression berücksichtigten Kriterien, wie Zusammenleben der Mäuse, sich gegenseitig sehen, hören, riechen und gegeneinander kämpfen sind für das Verstehen und die Erklärung des Wirkungsmechanismus der Antidepressiva sehr wichtig (Odagaki et al., 2001; Tanaka et al., 2000). In depressiven Menschen ist die phosphoCREB Expression erhöht (Odagaki et al., 2001). Tanaka et al. (Tanaka et al., 2000) fanden in Streß ausgesetzten Ratten eine ebenfalls Erhöhung der CREB-Phosphorylierung. Diese CREB-Phosphorylierung wurde durch die Blockade von spannungsabhängigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen zum normalen Niveau gebracht. Schwaninger et al. (Schwaninger et al., 1995b) hat in HIT Zellen gezeigt, daß Antidepressiva

die durch Membran-Depolarisation induzierte Calcium-Konzentration-Erhöhung und die Phosphorylierung von CREB hemmen.

Aus unseren Ergebnissen folgern wir, daß die durch psychosozialen Streß erhöhte CRE-vermittelte Transkription spezifisch durch Imipramin unterdrückt wird.

## Zusammenfassung

Die klinische Wirksamkeit von Antidepressiva ist gut belegt. Der molekulare Wirkungsmechanismus der Antidepressiva ist noch nicht geklärt. Doch existieren zahlreiche experimentelle Befunde, wonach die Antidepressiva in den Neurotransmitter-Stoffwechsel sowie die Neurotransmitter-Rezeptor-Wechselwirkung eingreifen. Antidepressiva wie Imipramin, Fluoxetin und Desipramin sind Hemmstoffe der neuronalen Wiederaufnahme von Botenstoffen wie Noradrenalin und Serotonin. Imipramin hemmt die Wiederaufnahme von Noradrenalin und Serotonin gleichermaßen aus dem synaptischen Spalt in die Nervenenden, während Desipramin bevorzugt Noradrenalin, Fluoxetin hingegen selektiv Serotonin hemmt. Entsprechend der sog. Amin-Hypothese erhöhen Antidepressiva auf diese Weise die Konzentration von diesen Neurotransmittern im synaptischen Spalt und können so einen bei Depressionen postulierten Mangel an Noradrenalin und/oder Serotonin an kritischen zentralen Synapsen beseitigen. Es besteht jedoch ein klarer Widerspruch zwischen der raschen Erhöhung der synaptischen Konzentration von biogenen Aminen durch Antidepressiva und der fehlenden akuten klinischen Wirksamkeit der Antidepressiva zu Beginn der Therapie. Die antidepressive Wirkung stellt sich unter fortgesetzter Therapie erst mit einer Verzögerung von 1 bis 3 Wochen ein. Dies weist auf langsame Adaptationen hin, welche der antidepressiven Wirkung zugrunde liegen, und welche auf molekularer Ebene mit einem durch Antidepressiva veränderten Muster an exprimierten Genen erklärt werden könnten. Veränderungen in der Expression von Genen werden auch als Ursache der Depression diskutiert. Antidepressiva könnten somit die in der Depression auftretenden Störungen in der Expression von Genen ausgleichen.

CREB ist ein kernständiger Transkriptionsfaktor, welcher durch eine Vielzahl von extrazellulären Botenstoffen und Wachstumsfaktoren reguliert wird. Seine DNA-Bindungsstelle, das sog. CRE (cAMP response element), findet sich in einer Vielzahl von Genen.

Im Rahmen der Untersuchungen zum molekularen Wirkungsmechanismus der Antidepressiva wurde die Wirkung dieser Arzneimittelgruppe auf die CREB/CRE-vermittelte Transkription in vivo geprüft. Hierzu wurden transgene Mauslinien etabliert, in denen 4 Kopien des CREs des Somatostatingens vor dem minimalen Thymidin-Kinase-Promotor des Herpes-Simplex-

Virus die Expression des Reportergens Luciferase steuern. Bei der Analyse von Organen adulter Mäuse wurden die höchsten Luciferaseaktivitäten im Gehirn, jedoch in der Peripherie praktisch keine Luciferaseaktivität gemessen. Eine Analyse des Gehirns zeigte hohe Luciferaseaktivität im Cortex, Hippocampus, Colliculi, Pons, Vorderhirn und Cerebellum.

Da Antidepressiva typischerweise nur bei depressiven Patienten stimmungsaufhellend wirken, nicht jedoch bei Gesunden, wurde an einem Tiermodell der Depression die Wirkung von Antidepressiva und psychosozialen Stress auf die CREB/CRE-vermittelte Transkription untersucht. Das hier verwendete Tiermodell der Depression beruht auf einem natürlichen Verhalten der Tiere und produziert psychosozialen Stress.

Die Versuche wurden mit akuter und mit chronischer Behandlung mit Antidepressiva durchgeführt, da die antidepressive Wirkung beim Patienten sich nicht sofort, sondern langsam (über 1 bis 3 Wochen) einstellt.

Eine akute Behandlung der Tiere mit Imipramin zeigte keine Wirkung auf die Expression des CRE-abhängigen Reportergens im Gehirn. Eine chronische Behandlung der transgenen Tiere mit Imipramin hemmte die Expression des CRE-abhängigen Reportergens in Pons und Hippocampus. Eine chronische Behandlung der transgenen Tiere mit Fluoxetin hemmte die Expression des CRE-abhängigen Reportergens in Pons, Hippocampus und Cortex. Desipramin zeigte keine Wirkung auf die Expression des CRE-abhängigen Reportergens. Psychosozialer Stress alleine erhöhte in Kleinhirn, Pons, Colliculi, Hippocampus, Vorderhirn und Cortex die Expression des CRE-abhängigen Reportergens. Chronische Behandlung mit Imipramin hat die durch den psychosozialen Stress induzierte Erhöhung der Expression des CRE-abhängigen Reportergens in Pons, Colliculi, Hippocampus, Hypothalamus, Vorderhirn und Cortex gehemmt.

Aus diesen Ergebnissen wird gefolgert, daß psychosozialer Stress und einige Antidepressiva die CRE-vermittelte Transkription im Gehirn gegensätzlich verändern. Die Untersuchungen stützen damit die Arbeitshypothese, daß der Transkriptionsfaktor CREB an der Ausbildung eines neuen Musters der Genexpression in Antwort auf Antidepressiva und damit am Mechanismus der klinisch antidepressiven Wirkung beteiligt ist.

## 6. Literaturverzeichnis

Abercrombie, E.D. and Zigmond, M.J. (1995). Modification of central catecholaminergic systems by stress and injury. In Bloom FE, Kupfer DJ, (eds9, Psychopharmacology. The Fourth Generation of Progress, New York, Raven Press, pp. 355-361.

Adam-Vizi, V. and Ligeti, E. (1991). Release of acetylcholine from rat brain synaptosomes by various agents in the absence of external calcium ions. *J. Physiol.* **353**:505-521.

Ahn, S.; Ginty, D.D. and Linden, D.J. (1999). A late phase of cerebellar long-term depression requires activation of CaMKIV and CREB. *Neuron* **23**:559-68.

Ahn, S.; Riccio, A. and Ginty, D.D. (2000). Spatial considerations for stimulus-dependent transcription in neurons. *Annu. Rev. Physiol.* **62**:803-23.

Alexandre, C.; Charnay, P. and Verrier, B. (1991). Transactivation of Krox-24 promoters by the HTLV-1 Tax protein through common regulatory elements. *Oncogene* **6**:1851-57.

Bading, H.; Ginty, D.D. and Greenberg, M.E. (1993). Regulation of gene expression in hippocampal neurons by distinct calcium signaling pathways. *Science* **260**:181-186.

Baker, G.B. and Greenshaw, A.J. (1989). Effects of long term administration of antidepressants and neuroleptics on receptors in the central nervous system. *Cell. Mol. Neurobiol.* **9**:1-44.

Bannister, A.J. and Koukarides, T. (1996). The CBP co-activator is a histone acetyltransferase. *Nature* **384**:641-43.

Bartsch, D.; Ghirardi, M.; Skehel, P.A.; Karl, K.A. and Herder, S.P. (1995). Aplysia CREB2 represses long-term facilitation: relief of repression converts transient facilitation into long-term functional and structural change. *Cell* **83**:979-92.



Bartsch, D.; Casadio, A.; Karl, K.A.; Serodio, P. and Kandel, E.R. (1998). CREB1 encodes a nuclear activator, a repressor, and a cytoplasmic modulator that form a regulatory unit critical for long-term facilitation. *Cell* **95**:211-23.

Beiter-Johnson, D. and Millhorn, D.E. (1998). Hypoxia induces phosphorylation of the cyclic AMP response element-binding protein by a novel signaling mechanism. *J. Biol. Chem.* **273**: 19834-19839.

Bengel, D.; Heils, A.; Petri, S.; Seemann, M., Glatz, K.; Andrews, A.; Murphy, D.L. and Lesch, K.P. (1997). Gene Structure and 5'-flanking regulatory region of the murine serotonin transporter. *Mol. Brain Res.* **44**:286-292.

Berkowitz, L.A.; Riabowal, K.T. and Gilman, M.Z. (1989). Multiple sequence elements of a single functional class are required for cyclic AMP responsiveness of the mouse c-fos promoter. *Mol. Cell. Biol.* **9**:4272-81

Berridge, M.J. (1998). Neuronal calcium signaling. *Neuron* **21**:13-26.

Berridge, M.J. Bootman, M.D., Lipp, P. (1998). Calcium - a life and death signal. *Nature* **395**:645-648.

Berthold, H. (1999). *Klinikleitfaden Arzneimitteltherapie*. Urban & Fischer, München Jena.

Biegon, A. and Israeli, M. (1987). Quantitative autoradiographic analysis of the effects of electroconvulsive shock on serotonin-2 receptor in male and female rats. *J. Neurochem.* **48**:1386-1391.

Blaustein, M.P. (1975). Effects of potassium, veratridine and scorpion venom on calcium accumulation and transmitter release by nerve terminals in vitro. *J. Physiol.* **247**:617-665.

Blier, P.; De Montigny, C., and Chaput, Y. (1987). Modifications of the serotonin system by

antidepressant treatments: implication for the therapeutic response in major depression. *J. Clin. Psychopharmacol.* **7**:24S-35S.

Blier, P.; De Montigny, C., and Chaput, Y. (1990). A role for serotonin system in the mechanism of action of antidepressant treatments: preclinical evidence. *J. Clin. Psychiatry* **51**:14-20.

Bonni, A.; Ginty, D.D.; Dudek, H. and Greenberg, M.E. (1995). Serine 133-phosphorylated CREB induces transcription via a cooperative mechanism that may confer specificity to neurotrophin signals. *Mol. Cell. Neurosci.* **6**:168-83.

Bourtchuladze, R.; Frenguelli, B.; Blendy, J.; Cioffi, D. and Schutz, G. (1994). Deficient long-term memory in mice with a targeted mutation of the cAMP-responsive element-binding protein. *Cell* **79**:59-68.

Brady, L.S.; Whitfield, H.J.; Fox, R.J.; Gold, P.W., and Herkenham, M. (1991). Long-term antidepressant administration alters corticotropin-releasing hormone, tyrosine hydroxylase, and mineralocorticoid receptor gene expression in rat brain. *J. Clin. Invest.* **87**:831-837.

Brindle, P.; Linke, S. and Montminy, M. (1993). Protein kinase A dependent activator in transcription factor CREB reveals new roles for CREM repressors. *Nature* **364**:821-824.

Brinster, R.L.; Chen, H.Y.; Trumbauer, M.E.; Yagle, M.K. and Oalmiter, R.D. (1985). Factors affecting the efficiency of introducing foreign DNA into mice by microinjecting eggs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **82**:4438-4442.

Caterall, W.A. (1980). Neurotoxins that act on voltage-sensitive sodium channels in excitable membranes. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **20**:15-43.

Charney, D.S.; Deutsch, A.Y.; Krystal, J.H.; Southwick, S.M. and Davis, M. (1993). Psychobiologic mechanism of posttraumatic stress disorder. *Arch. Gen. Psychiatr.* **50**:294-

305.

Chin, D. and Means, A.R. (2000). Calmodulin: a prototypical calcium sensor. *Trends Cell. Biol.* **10**:322-328.

Chrivia, J.C.; Kwok, R.P.; Lamb, N.; Nagiwar, M.; Montminy, M.R. and Goodman, R.H. (1993). Phosphorylated CREB binds specifically to the nuclear protein CBP. *Nature* **365**:855-859.

Collins, S.; Ostrowski, J. and Lefkowitz, J. (1993). Cloning and sequence analysis of the human  $\beta_1$ -adrenergic receptor 5'-flanking promoter region. *Biochim. Biophys. Acta.* **1172**:171-174.

Dahlstrom A. and Fuxe K. (1964). Evidence for the existence of monoamine-containing neurons in the central nervous system. I. Demonstration of monoamines in the cell bodies of brainstem neurons. *Acta Physiol. Scand.* **62**:1-55.

Dash, P.K.; Hochner, B. and Kandel, E.R. (1990). Injection of the cAMP-responsive element into the nucleus of Aplysia sensory neurons blocks long-term facilitation. *Nature* **345**:718-21.

Dash, P.K.; Karl, K.A.; Colicos, M.A.; Prywes, R. and Kandel, E.R. (1991). cAMP response element-binding protein is activated by  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin- as well as cAMP-dependent protein kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**:5061-65.

Deak, M.; Clifton, A.D.; Lucocq, L.M. and Alessi, D.R. (1998). Mitogen- and stress-activated protein kinase-1 (MSK1) is directly activated by MAPK and SAPK2/p38, and may mediate activation of CREB. *EMBO. J.* **17**:4426-41.

De Groot, R.P.; Ballou, L.M. and Sassone-Corsi, P. (1994). Positive regulation of the cAMP-responsive activator CREM by the p70 S6 kinase: an alternate route to mitogen-induced gene expression. *Cell* **79**:81-91.

Deisseroth, K.; Bito, H. and Tsien, R.W. (1996). Signaling from synapse to Nucleus: Postsynaptic CREB Phosphorylation during Multiple Forms of Hippocampal Synaptic Plasticity. *Neuron* **16**:89-101.

De Montigny, C., and Aghajanian, G.K. (1978). Tricyclic antidepressants: longterm treatment increases responsivity of rat forebrain neurones to serotonin. *Science* **202**:1303-1306.

De Montigny, A.; Chaput, Y. and Blier, P. (1990). Modification of serotonergic neuron properties by long-term treatment with serotonin reuptake blockers. *J. Clin. Psychiatry* **51**:4-8.

De Wet, J.R.; Wood, K.V.; De Luca, M.; Heinski, D.R. and Subramani, S. (1987). Firefly luciferase gene: structure and expression in mammalian cells. *Mol.Cell. Biol.* **7**:725-737.

Drevets, W.C. (2000). Neuroimaging studies of mood disorders: Implications for a neural model of major depression. *Biol. Psychiatry* **48**:813-829.

Drevets, W.C.; Cadde, K. and Krishnan, R. (Oxford Press, New York, 1999). Neuroimaging studies of depression. In *Neurobiology of Mental Illness*. (eds. Charney, D.S., Nester, E.J. and Bunney, B.S.) 394-418.

Du, K. and Montminy, M. (1998). CREB is a regulatory target for the protein kinase Akt/PKB. *J. Biol. Chem.* **273**:32377-79.

Duman, R.S.; Malberg, J. and Thome, J. (1999). Neural Plasticity to Stress and Antidepressant Treatment. *Biol. Psychiatry* **46**:1181-1191.

Eckert, A. and Müller, E. (1998). *Arzneimittelinteraktionen mit Antidepressiva*. Wiss. Verlagsgesellschaft Stuttgart.

Enslen, H.; Sun, P.; Brickey, D.; Soderling, S.H.; Klamo, E. and Soderling, T.R. (1994). Characterization of  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase IV. Role in transcriptional

regulation. J. Biol. Chem. **269**:15520-15527.

Estler, C.-J. (2000). Pharmakologie und Toxikologie. Schattauer Verlag Stuttgart.

Feinberg, A.P. and Vogelstein, B. (1983). A technique for radiolabeling DNA.restriction endonuclease fragments to high specific activity. Anal. Biochem. **132**:6-13

Finkbeiner, S. and Greenberg, M.E. (1998).  $\text{Ca}^{2+}$  Channel-Regulated Neuronal Gene Expression. J. Neurobiol. **37**:171-189.

Forth, W.; Förstermann, K.; Henschler, D.; Rummel, W. und Starke, K. (1998). Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. Spektrum Verlag Heidelberg.

Foulkes, N.S. and Sassone-Corsi, P. (1996) Transcription factors coupled to the cAMP-signalling pathway. Biochem. Biophys. Acta **1288**:F101-F121.

Ghosh, A.; Ginty, D.D.; Bading, H. and Greenberg, M.E. (1994). Calcium regulation of gene expression in neuronal cells. J. Neurobiol. **25**:294-303.

Ginty, D.D.; Kornhauser, J.M.; Thompson, M.A.; Bading, H. and Mayo, K.E. (1993). Regulation of CREB phosphorylation in the suprachiasmatic nucleus by light and a circadian clock. Science **260**:238-41.

Ginty, D.D.; Bonni, A. and Greenberg, M.E. (1994). Nerve growth factor activates a Ras-dependent protein kinase that stimulates c-fos transcription via phosphorylation of CREB. Cell **77**:13-25.

Gonzalez, G.A. and Montminy, M.R. (1989). Cyclic AMP stimulates somatostatin gene transcription by phosphorylation of CREB at serine **133**. Cell **59**:675-680.

Gonzalez, G.A.; Menzel, P.; Leonard, J.; Fischer, W.H. and Montminy, M.R. (1991).

Characterization of motifs which are critical for activity of cyclic AMP responsive transcription factor CREB. *Mol. Cell. Biol.* **11**:1306-1312.

Gordan, J.W.; Scangos, G.A.; Plotkin, D.J.; Barbosa, J.A. and Ruddle, F.H. (1980). Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**:7380-7384.

Graybiel, A.M. (1990). Neurotransmitters and neuromodulators in basal ganglia. *Trends Neurosci.* **13**:244-254.

Greenberg, M.E.; Ziff, E.B. and Greene, L.A. (1986). Stimulation of neuronal acetylcholine receptors induces rapid gene transcription. *Science* **234**:80-83.

Hanson, P.I. and Schulman, H. (1992). Neuronal  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinases. *Annu. Rev. Biochem.* **61**:559-601.

Hartwig, J.H.; Thelen, M.; Rosen, A.; Janmey, P.A.; Nairn, A.C. and Aderem, A. (1992). MARCKS is an actin filament crosslinking protein regulated by protein kinase C and calcium-calmodulin. *Nature* **356**:618-622.

Heninger, G.R. and Charney, D.S. (1987). Mechanism of action of antidepressant treatments: implications for the etiology and treatment of depressive disorders, in *Psychopharmacology: The Third Generation of Progress* (H.Y. Meltzer, ed). Raven Press, New York, 535-544.

Hensler, J.G.; Kovachich, G.B. and Frazer, A. (1991). A quantitative autoradiographic study of serotonin<sub>1A</sub> receptor regulation: effect of 5,7-dihydroxytryptamine and antidepressant treatments. *Neuropsychopharmacologie* **4**:131-144.

Hogan, B.; Costantini, F. and Lacy, E. (1986). *Manipulating the mouse embryo. A Laboratory manual.* Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY. Hosoda, K. and Duman, R.S. (1993). Regulation of  $\beta_1$ -adrenergic receptor mRNA and ligand binding by antidepressant

treatments and norepinephrine depletion in rat frontal cortex. *J. Neurochem.* **60**:1335-1343.

Impey, S.; Mark, M.; Villacres, E.C.; Poser, S.; Chavkin, C. and Storm, D.R. (1996). Induction of CRE-mediated gene expression by stimuli that generate long-lasting LTP in area CA1 of the hippocampus. *Neuron* **16**:973-982.

Impey, S.; Obrietan, K.; Wong, S.T.; Poser, S. and Yano, S. (1998). Cross talk between ERK and PKA is required for  $\text{Ca}^{2+}$  stimulation of CREB-dependent transcription and ERK nuclear translocation. *Neuron* **21**:869-83.

Iordanov, M.; Bender, K.; Ade, T.; Schmid, W. and Sachsenmaier, C. (1997). CREB is activated by UVC through a p38/HOG-1-dependent protein kinase. *EMBO J.* **16**:1009-22.

Iversen, L.L. (1975). Uptake processes for biogenic amines. In Iversen, L.L., Iversen S.D., Snyder, S.H. (eds), *Handbook of Psychopharmacology*, vol 3, New York, Plenum, pp 381-442.

Jacobs B. L. and Azmitia E. C. (1992). Structure and funktion of the brain serotonin system. *Physiol Rev* **72**:165-229.

Jagadeesh, S.R. and Subhash, M.N. (1998). Effect of Antidepressants on Intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  Mobilization in Human Frontal cortex. *Biol. Psychiatry* **44**:617-621.

Jolas, T.; Haj-Dahmane, S.; Kidd, E.J.; Langlois, X.; Lanfumey, L.; Fattacini, C.M.; Vantalon, V.; Laporte, A.M.; Adrien, J.; Gozlan, H. and Hamon, M. (1994). Central pre- and postsynaptic 5-HT<sub>1A</sub> receptors in rats treated chronically with a novel antidepressant, cericlamine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **268**:1432-1443.

Katz, R.J. (1981). Animal model and human depressive disorders. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **5**:231-246.

Katz, R.J.; Roth, K.A. and Carrol, B.J. (1981). Acute and chronic stress effects on open field activity in the rat: Implication for model of depression. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **5**:247-251.

Kelso, S.R.; Nelson, T.E. and Leonard, J.P. (1992). Protein kinase C-mediated enhancement of NMDA currents by metabotropic glutamate receptors in *Xenopus* oocytes. *J. Physiol. Lond.* **449**:705-718.

Kilbourne, E.J.; Nankova, B.B.; Lewis, E.J.; McMahon, A.; Osaka, H.; Sabban, D.B., and Sabban, E.L. (1992). Regulated expression of the tyrosine hydroxylase gene by membrane depolarization. *J. Biol. Chem.* **267**:7563-7569.

Koch R.A. and Barish ME. (1994). Perturbation of intracellular calcium and hydrogen ion regulation in cultured mouse hippocampal neurons by reduction of the sodium ion concentraion gradient. *J. Neurosci.* **14**:2585-2593.

Kudryavtseva, N.N.; Bakshtanovskaya, I.V. and Koryakina, L.A. (1991). Social Model of Depression in Mice of C57/BL/6J Strain. *Pharmacology Biochemistry & Behavior.* **38**:315-320.

Kudryavtseva, N.N. (1987). Peculiarities of forming of agonistic behavior in mice using a model of sensory contact. Novosibirsk: Institute of Cytology and Genetics; (in Russian).

Kudryavtseva, N.N. (1988). Properties of submassive mice reaction to distant social stimuli. *Zh. Vyss. Nerv. Deiat.* **1**:94-99 (in Russian).

Kudryavtseva, N.N. and Bakshtanovskaya, I.V. (1988). The development of depression-like states in submissive male mice of C57BL/6J strain. Novosibirsk: Institute of Cytology and Genetcs. (in Russian, preprint).

Kudryavtseva, N.N. and Bakshtanovskaya, I.V. (1989). Experience of defeat increase the susceptibility to catatonic-like state in mice. *Behav. Proc.* **20**:139-149.



Kudryavtseva, N.N. and Sitnikov, A.P. (1988). Influence of genotype on the formation of aggressive and submissive behavior in mice. *Neurosci. Behav. Physiol.* **18**:38-43.

Kwok, R.P.; Lundblad, J.R.; Chrivia, J.C.; Richards, J.P.; Bachinger, H.P.; Brennan, R.G.; Roberts, S.G.; Green, M.R. and Goodman, R.H. (1994). Nuclear protein CBP is a coactivator for the transcription factor CREB. *Nature* **370**:223-226.

Lauder, J.M. (1993). Neurotransmitters as growth regulatory signals: role of receptors and second messengers. *Trends Neurosci.* **16**:233-240.

Laux, G. (1998). Antidepressiva bei nicht-depressiven Störungen. Wiss. Verlagsgesellschaft Stuttgart.

Le Poul, E.; Laaris, N.; Doucet, E.; Laporte, A.; Hamon, M. and Lanfumey, L. (1995). Early desensitization of somato-dendritic 5-HT<sub>1A</sub> autoreceptors in rats treated with fluoxetine or paroxetine. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* **352**:141-148.

Lerea, L.S. ; Butler, L.S. and McNamara, J.O. (1992). NMDA and non-NMDA receptor-mediated increase of c-fos mRNA in dentate gyrus neurons involves calcium influx via different routes. *J. Neurosci.* **12**:2973-2981.

Lesch, K.P.; Hoh, A.; Schulte, H.M.; Osterheider, M. and Muller, T. (1991). Long-term fluoxetine treatment decreases 5HT<sub>1A</sub> receptor responsivity in obsessive-compulsive disorder. *Psychopharmacology* **105**:1415-1420.

Lesch, K.P. and Manji, H.K. (1992). Signal-transducing G proteins and antidepressant drugs: evidence for modulation of a submit gene expression in rat brain. *Biol. Psychiatry* **32**:549-579.

Li, Q.; Levey, A.D.; Cabrera, T.M.; Brownfield, M.S.; Battaglia, G. and Van der Kar, L.D. (1993). Long-term fluoxetine, but not desipramine, inhibits the ACTH and oxytocin responses to the 5-HT-1A agonist, 8-OH-DPAT, in male rats. *Brain Res.* **630**:215-221.

- Li, Q.; Brownfield, M.S.; Levy, A.D.; Battaglia, G.; Abrera, T.M.; Van der Kar, L.D. (1994). Attenuation of hormone responses to the 5-HT<sub>1A</sub> agonist ipsapirone by long-term treatment with fluoxetine, but not desipramine, in male rats. *Biol. Psychiatry* **36**:300-308.
- Liu, F.C. and Graybiel, A.M. (1996). Spatiotemporal dynamics of CREB phosphorylation: transient versus sustained phosphorylation in the developing striatum. *Neuron* **17**:1133-44.
- McCabe, J.T. and Burrell, A.S. (2001). Alterations of AP-1 and CREB protein DNA binding in rat supraoptic and paraventricular nuclei by acute and repeated hyperosmotic stress. *Brain Res. Bull.* **55**:347-58.
- Meder, W.; Fink, K. and Gothert, M. (1997). Involvement of different calcium channels in K<sup>+</sup>- and veratridine-induced increases of cytosolic calcium concentration in rat cerebral cortical synaptosomes. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* **356**:797-805.
- Meyer, T.E. and Habener, J.F. (1993). Cyclic adenosine 3',5'-monophosphate response element binding protein (CREB) and related transcription-activating deoxyribonucleic acid-binding proteins. *Endocr. Rev.* **14**:269-290.
- Mongeau, R.; Blier, P. and De Montigny, C. (1997). The serotonergic and noradrenergic systems of the hippocampus: their interactions and the effects of antidepressant treatments. *Brain Res. Rev.* **23**: 145-195.
- Montminy, M.R.; Sevarino, K.A.; Wagner, J.A.; Mandel, G. and Goodman, R.H. (1986). Identification of a cyclic-AMP-responsive element within the rat somatostatin gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**:6682-6686.
- Montminy, P. (1997). Transcriptional activation. Something new to hang your Hat on. *Nature* **387**:654-5.

Müller-Oehrlinghausen, B. (1999). Handbuch der unerwünschten Arzneimittelwirkungen. Urban & Fischer.

Murphy, T.H.; Worley, P.F. and Baraban, J.M. (1991). L-type voltage-sensitive calcium channels mediate synaptic activation of immediate early genes. *Neuron* **7**:625-635.

Mutschler, E. (1996). Arzneimittelwirkungen: Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie. Wiss. Verlagsgesellschaft Stuttgart.

Nestler, E.J.; McMahon, A.; Sabban, E.L.; Tallman, J.F., and Duman, R.S. (1990). Chronic antidepressant administration decreases the expression of tyrosine hydroxylase in the rat locus coeruleus. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **87**:7522-7526.

Neumaier, J.F.; Root, D.C. and Hamblin, M.W. (1996). Chronic fluoxetine reduces serotonin transporter mRNA and 5-HT1B mRNA in sequential manner in the rat dorsal raphe nucleus. *Neuropsychopharmacology* **15**:515-522.

Nordeen, S. K. (1988). Luciferase reporter gene vectors for analysis of promoters and enhancers. *Bio Techniques* **6**:454-457.

Odagaki, Y.; Garcia-Sevilla, J.A.; Huguelet, P.; La Harpe, R.; Koyama, T. and Guimon, J. (2001). Cyclic AMP-mediated signaling components are upregulated in the prefrontal cortex of depressed suicide victims. *Brain Research* **898**:224-231.

Oetjen, E.; Diedrich, T.; Eggers, A.; Eckert, B. and Knepel, W. (1994). Distinct properties of the cAMP-responsive element of the rat insulin I gene. *J. Biol. Chem.* **269**:27036-27044.

Ogryzko, V.V.; Schiltz, R.L.; Russanova, V.; Howard, B.H. and Nakatani, Y. (1996). The transcriptional coactivators p300 and CBP are histone acetyltransferases. *Cell* **87**:953-59.

Owens, M.J. and Nemeroff, C.B. (1994). The role of serotonin in the pathophysiology of depression: Focus on the serotonin transporter. *Clin. Chem.* **40**:288-295.

Palmiter, R. D.; Brinster, R. L.; Hammer, R. E.; Trumbauer, M. E.; Rosenfeld, M. G.; Birnberg, N. C. and Evans, R. M. (1982). Dramatic growth of mice that develop from eggs microinjected with metallothionein-growth hormone fusion genes. *Nature* **300**:611-615.

Palmiter, R. D. and Brinster, R. L. (1985). Transgenic mice. *Cell* **41**:343-345.

Peroutka, S.J. and Snyder, S.M. (1980). Long-term antidepressant treatment decreases spiroperidol-labelled serotonin receptor binding. *Science* **210**:88-90.

Pham, T.A.; Impey, S.; Storm, D.R. and Stryker, M.P. (1999). CRE-mediated gene transcription in neocortical neuronal plasticity during the developmental critical period. *Neuron* **22**:63-72.

Redmond, D.E. and Huang, Y.H. (1979). New evidence for a locus coeruleus-norepinephrine connection with anxiety. *Life Sci.* **25**:2149-2162.

Regehr, W.G.; Connor, J.A. and Tank, D.W. (1989). Optical imaging of calcium accumulation in hippocampal pyramidal cells during synaptic activation. *Nature* **341**:533-36.

Richard, F.; Faucon-Biguet, N.; Labautu, R.; Rollet, D.; malle, J. and Buda, M. (1988). Modulation of tyrosine hydroxylase gene expression in rat brain and adrenals by exposure to cold. *J. Neurosci Res.* **20**:32-37.

Sabban, E.L. and Kvetnansky, R. (2001). Stress-triggered activation of gene expression in catecholaminergic systems: dynamics of transcriptional events. *TRENDS in Neurosci.* **24**:91-98.

Sambrook, J.; Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning. A laboratory manual.*

2. Auflage. Cold Spring Harbor Laboratory.

Sargent, P.; Williamson, D.J.; Pearson, G.; Odontiades, J. and Cowen, P.J. (1997). Effect of paroxetine and nefazodone on 5-HT<sub>1A</sub> receptor sensitivity. *Psychopharmacology* **132**:296-302.

Sasaki, M.; Gonzalez-Zulueta, M.; Huang, H.; Herring, W.J.; Ahn, S.; Ginty, D.D.; Dawson, V.L. and Dawson, T.M. (2000). Dynamic regulation of neuronal NO synthase transcription by calcium influx through a CREB family transcription factor-dependent mechanism. *Proc Natl Acad Sci. USA* **97**:8617-22.

Sassone-Corsi, P. (1995). Transcription factors responsive to cAMP. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* **11**:355-77.

Schildkraut, J.J. (1965). The catecholamine hypothesis of affective disorders, a review of the supporting evidence. *Am. J. Psychiatr.* **12**:509-522.

Schöler, H.R.; Hatzopoulos, A.K.; Balling, R.; Suzuki, N. and Gruss, P. (1989). A family of octamer-specific proteins present during mouse embryogenesis: evidence for germline-specific expression of an Oct factor. *EMBO J.* **8**:2543-2550.

Schwaninger M, Lux R, Blumr R, Oetjen E, Hidaka H. and Knepel W. (1993a). Membrane depolarization and calcium influx induce glucagon gene transcription in pancreatic islet cells through the cyclic AMP-responsive element. *J.Biol. Chem.* **268**:5168-5177.

Schwaninger, M.; Blume, R.; Oetjen, E.; Lux, G. and Knepel, W. (1993b). Inhibition of cAMP-responsive element-mediated gene transcription by cyclosporin A und FK506 after membrane depolarization. *J. Biol. Chem.* **268**:23111-23115.

Schwaninger, M.; Blume, R.; Krüger, M.; Lux, G.; Oetjen, E and Knepel, W. (1995a). Involvement of the Ca<sup>2+</sup>-dependent phosphatase calcineurin in gene transcription that is

stimulated by cAMP through cAMP response elements. *J. Biol. Chem.* **270**:8860-8866.

Schwaninger, M.; Schöfl, R.; Blume, R.; Rössig, L. and Knepel, W. (1995b). Inhibition by Antidepressant Drugs of Cyclic AMP Response Element-Binding Protein/Cyclic AMP Respons Element-Directed Gene Transcription. *Mol. Pharmacol.* **47**:1112-1118.

Seckl, J.R. and Fink, G. (1992). Antidepressants increase glucocorticoid and mineralocorticoid receptor mRNA expression in rat hippocampus in vivo. *Neuroendocrinology* **55**:621-626.

Sheng, M. and Greenberg, M.E. (1990). The regulation and function of c-fos and other immediate early genes in the nervous system. *Neuron* **4**:477-485.

Sheng, M.; McFadden, G. and Greenberg, M.E. (1990). Membrane depolarization and calcium induce c-fos transcription via phosphorylation of transcription factor CREB. *Neuron* **4**:571-582.

Sheng, M.; Thompson, M.A. and Greenberg, M.E. (1991). CREB: a calcium-regulated transcription factor phosphorylated by CaM kinases. *Science* **252**:1427-30.

Shieh, P.B.; Hu, S.C.; Bobb, K.; Timmusk, T. and Ghosh, A. (1998). Identification of a signaling pathway involved in calcium regulation of BDNF expression. *Neuron* **20**:727-740.

Skolnic, P., Layer, R.T., Popk, P., Nowak, G.; Paul, I.A. and Trullas, R. (1996). Adaptation of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors following antidepressant treatment: Implications for the pharmacotherapy of depression *Pharmacopsychiatry* **29**:23-26.

Spengler, D.; Rupprecht, R.; Van, L.P., and Holsboer, F. (1992). Identification and characterization of a 3',5'-cyclic adenosine monophosphate-responsive element in the human corticotropin-releasing hormone gene promoter. *Mol. Endocrinol.* **6**:1931-1941.

Spradling, A.C. and Rubin, G.M. (1982). Transposition of cloned P elements into *Drosophila* germ line chromosomes. *Science* **218**:341-347.

Stone, E.A.; Freedman, L.S. and Morgano, L.E. (1978). Brain and adrenal tyrosine hydroxylase activity after chronic footshock stress. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **9**:551-553.

Sun, P.; Enslen, H.; Myung, P.S. and Maurer, R.A. (1994). Differential activation of CREB by  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase type II and type IV involves phosphorylation of a site that negatively regulates activity. *Genes Dev.* **8**:2527-2539.

Tanaka, K.; Nogawa, S.; Nagata, E.; Suzuki, S.; Dembo, T.; Kosakai, A. and Fukuuchi Y. (2000). Effects of Blockade of voltage-sensitive  $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^{+}$  channels by a novel phenylpyrimidine derivative, NS-7, on CREB phosphorylation in focal cerebral ischemia in the rat. *Brain Research* **873**:83-93.

Tan, Y.; Rouse, J.; Zhang, A.; Caraiti, S. and Cohen, P. (1996). FGF and stress regulate CREB and ATF-1 via a pathway involving p38 MAP kinase and MAP-KAP kinase-2. *EMBO J.* **15**:4629-42.

Tao, X.; Finkbeiner, S.; Arnold, D.B.; Shaywitz, A. and Greenberg, M.E. (1998).  $\text{Ca}^{2+}$  influx regulates BDNF expression by a CREB-dependent mechanism. *Neuron* **20**:709-726.

Thoenen, H. (1970). Induction of tyrosine hydroxylase in peripheral and central adrenergic neurones by cold-exposure of rats. *Nature* **228**:861-862.

Thome, J.; Sakai, N.; Shin, K.-H.; Steffen, C.; Zhang, Y.-J.; Impey, S.; Storm, D. and Duman, R.S. (2000). cAMP Response Element-Mediated Gene Transcription is Upregulated by Chronic Antidepressant Treatment. *J. Neurosci.* **20**:4030-4036.

Thompson, M.A.; Ginty, D.D.; Bonni, A. and Greenberg, M.E. (1995). L-type voltage-sensitive  $\text{Ca}^{2+}$  channel activation regulates c-fos transcription at multiple levels. *J. Biol. Chem.*

**270**:4224-4235.

Tully, T.; Preat, T.; Boynton, S.C. and Del Vecchio, M. (1994). Genetic dissection of consolidated memory in *Drosophila*. *Cell* **79**:35-47.

Turecek, R.; Vyklicky, L.; Vlachova, V. and Vyklicky, L. (1995). G-protein modulation of glycine-resistant NMDA receptor desensitization in rat cultured hippocampal neurons. *Eur. J. Neurosci.* **7**:1826-1830.

Valdman, A.V.; Poshivalov, V.P. (1980). Some effects of modelling the behavior pathology in animal. In: *Experimental and clinical psychopharmacology*, Moskow: Nauka 3-18.

Vanhoutte, P.; Barnir, J.V.; Guibert, B.; Pages, C. and Besson, M.J. (1999). Glutamate induces phosphorylation of Elk-1 and CREB, along with c-fos activation, via an extracellular signal-regulated kinase-dependent pathway in brain slices. *Mol. Cell. Biol.* **19**:136-46.

Walton, M.R. and Dragunow, M. (2000). Is CREB a Key to neuronal survival?. *TINS.* **23**:48-53.

Welner, S.A.; De Montigny, C.; Desroches, J.; Desjardinsk, P., and Suranyi-Cadotte, B. E. (1989). Autoradiographic quantification of serotonin<sub>1A</sub> receptors in rat brain following antidepressant drug treatment. *Synapse.* **4**:347-352.

Westenbroek, R.E.; Ahljianian, M.K. and Catterall, W.A. (1990). Clustering of L-type Ca<sup>2+</sup> channels at the base of major dendrites in hippocampal pyramidal neurons. *Nature* **347**:281-84.

Wong, M.L.; Khatri, P.; Licino, J.; Esposito, A. and Gold, P.W. (1996). Identification of hypothalamic transcripts upregulated by antidepressants. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **229**:275-279.



Xing, J.; Ginty, D.D. and Greenberg, M.E. (1996). Coupling of the RAS-MAPK pathway to gene activation by RSK2, a growth factor-regulated CREB kinase. *Science* **273**:959-63.

Yin, J.C.P.; Wallach, J.S.; Del Vecchio, M.; Wilder, E.L. and Zhou, H. (1994). Induction of a dominant negative CREB transgene specifically blocks long-term memory in *Drosophila*. *Cell* **79**:49-58.

Yokoshiki, H.; Sumii, K. and Sperelakis, N. (1996). Inhibition of L-type calcium current in rat ventricular cells by the tyrosine kinase inhibitor, genistein and its inactive analog, daidzein. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **28**:807-814.

Zhu, Q.S.; Chen, K. and Shih, J.C. (1995). Characterization of the human 5-HT<sub>2A</sub> receptor gene promoter. *J. Neurosci.* **15**:4885-4895.

Zigmond, R.E.; Schon, F. and Iversen, L.L. (1974). Increased tyrosine hydroxylase activity in the locus coeruleus of rat brain stem after reserpine treatment and cold stress. *Brain Res.* **70**:547-552.

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren:

Bremecker, Dilg, Fuhrmann, Haake, Häberlein, Hanefeld, Hartke, Hilp, Hölzl, Hocke, Kissel, Kriegelstein, Kuschinsky, Maser, Matusch, Netter, Seitz, Vohland, Wichtl, Wichtl-Bleier.

## **Danksagungen**

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. W. Knepel für die Überlassung der interessanten Themenstellung, seine fachliche Unterstützung sowie für anregende Diskussionen, die wesentlich zum Fortgang der Arbeit beigetragen haben.

Herrn Prof. Kuschinsky danke ich für die Übernahme der Betreuung aus dem Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie.

Bei Herrn S. Beimesche und Frau I. Cierny möchte ich mich für die Kooperation bei der Herstellung und Analyse der transgenen Tiere bedanken.

Bei Doris Krause möchte ich mich für die stete Hilfsbereitschaft und tatkräftige Unterstützung bei zahlreichen Experimenten bedanken.

Für das sorgfältige Korrekturlesen geht ein großes Dankeschön an Dr. Sven Schinner, Dr. Rahman Schamsadin und Sabine Teichler.

Allen jetzigen und ehemaligen Mitarbeitern der Abteilung für Molekulare Pharmakologie, die zum Gelingen der vorliegenden Dissertation beigetragen und für eine freundliche Atmosphäre im Laboralltag gesorgt haben, sei hiermit gedankt.

Für viele Tips, anregende Diskussionen danke ich Elke, Roland, Frau Herrman, Ulli, Corrina.

Mein spezieller Dank geht an meine Frau Naela und an meine Familie für die Unterstützung, für ihr Verständnis und dafür, daß sie immer für mich da waren.

## **Publikationen**

Beimesche, S.; Neubauer, A.; Herzig, H.; Grzeskowiak, R.; Diedrich, T.; Cierny, I.; Scholz, D.; Alejel, T. and Knepel, W. (1999). Tissue-Specific Transcriptional Activity of a Pancreatic Islet Cell-Specific Enhancer Sequence/Pax6-Binding Site Determined in Normal Adult Tissue in Vivo Using Transgenic Mice. *Mol. Endocrinol.* **13**:718-728.

Alejel, T.; Beimesche, S.; Cierny, I.; Krause, D. and Knepel, W. Effect of antidepressant drugs and psychosocial stress on CRE-dependent reporter gene expression in the brain of transgenic mice. (In Vorbereitung).

## **Lebenslauf**

Name	Tahseen Alejel
Geburtsdatum	19.10.64
Geburtsort	Gaza/Gazastreifen
Familienstaand	verheiratet, 2 Kinder
Grundschule	1970-1976
Mittelschule	1977-1980
Gymnasium	1981-1983
Pharmaziestudium	1987-1992 an der Philipps-Universität in Marburg
Pharmaziepraktikum	1993-1994 in der Markgrafen-Apotheke in Frankfurt/M
Fortbildung/Staatsexamen	1995-1996 in Frankfurt/M
Promotion/Praktika	seit 1996 im Institut für Pharmakologie und Toxikologie im Fachbereich Humanmedizin der Georg-August-Universität in Göttingen